

Aus dem Institut für Virologie  
der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

## DISSERTATION

# **Untersuchungen zur Epidemiologie der Mutter-Kind Übertragung des Humanen Cytomegalievirus auf Frühgeborene und zum molekularen Mechanismus der (Re)-aktivierung des Virus während der Laktation**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Johannes Meier  
aus Giessen

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter:   1. Prof. Dr. Susanna Prösch  
                  2. Prof. Dr. Gerhard Jahn  
                  3. Prof. Dr. Roland R. Wauer

Datum der Promotion:       07. April 2005

## Abstract deutsch

Im Rahmen einer prospektiven Studie wurde die Inzidenz der Reaktivierung des Humanen Cytomegalievirus (HCMV) bei stillenden Müttern, sowie die Virusübertragung auf ihre Frühgeborenen untersucht. Mit In vitro Experimenten wurde der Einfluss von Muttermilch auf die Reaktivierung und Replikation vom HCMV untersucht.

Die Muttermilch von 73 Müttern, sowie Urin- und Trachealproben ihrer 89 Frühgeborenen wurden über 2 Monate post partum wöchentlich auf HCMV DNA untersucht. Eine Reaktivierung des Virus wurde bei 95% der latent infizierten Mütter beobachtet. Zu einer Virusübertragung kam es bei 42% der HCMV-positiven Müttern auf ihre gestillten Kinder. Insgesamt infizierten sich 22 der 89 Frühgeborenen im Untersuchungszeitraum, in zwei Fällen kam es zu schweren symptomatischen Krankheitsverläufen. Infizierte Frühgeborene zeigten im Vergleich zu Nicht-Infizierten höhere Inzidenzen von Amnioninfektionssyndrom, respiratory distress syndrome und Bronchopulmonarer Dysplasie. Die Studie bestätigt ein signifikant hohes Risiko einer Übertragung von HCMV durch Muttermilch auf Frühgeborene mit teils schwerwiegendem Verlauf und eine hohe Reaktivierungsrate von HCMV in der laktierenden Brust. Daher wurde ein möglicher Einfluss von Muttermilch auf die Reaktivierung bzw. Replikation von HCMV konstatiert und der Effekt von Muttermilch auf die Aktivität des HCMV Immediate Early (IE)1/2 Enhancer/Promotors, die Virusreplikation und IE Protein Synthese in monozytären Zellen und humanen Lungenfibroblasten untersucht. Sämtliche Milchproben stimulierten den HCMV Immediate Early (IE)1/2 Enhancer/Promotor und die IE Protein Synthese in einer charakteristischen Kinetik, mit höchsten Stimulationsraten durch Molkeproben der 1.-2. Woche post partum, 2-3 Wochen vor dem Zeitpunkt der höchsten Viruslast in der Muttermilch. Durch Promotermutanten und inhibitorische Substanzen wurde gezeigt, dass die Stimulation des IE1/2 Enhancer/Promotors ein multifaktorieller Prozeß ist, an dem Glukokortikoide eine signifikante Rolle spielen.

HCMV, Frühgeborene, Stillen, Reaktivierung

## Abstract englisch

In a clinical trial, the incidence of human cytomegalovirus (HCMV) reactivation in breastfeeding mothers, virus transmission to their breastfed preterm infants and the effects of breast milk on HCMV reactivation and replication were studied.

Breast milk from 73 mothers as well as urine and tracheal aspirates of their 89 infants were screened weekly for HCMV-DNA during 2 months after delivery. HCMV reactivation and virus shedding could be confirmed in 95% of latently infected mothers. Mother-to-child transmission was concluded for 42% HCMV DNA positive mothers. 22 breastfed infants acquired HCMV infection, two of them with severe symptomatic HCMV infection. The infected infants demonstrated higher incidences of amniotic infection, respiratory distress syndrome and bronchopulmonary dysplasia compared to noninfected infants. We could therefore confirm a high incidence of HCMV reactivation in lactating mothers and a significant risk of transmission to preterm infants by breastfeeding with the possibility of severe disease. The high rates of virus reactivation in mothers led us to focus on the effect of human milk on HCMV reactivation and replication in vitro: Breast milk from 12 breastfeeding mothers was tested for their effects on HCMV Immediate Early (IE)1/2 enhancer/promoter activity, viral replication and IE protein expression in monocytic cell lines and human embryonal lung fibroblasts. All milk samples stimulated HCMV IE1/2 enhancer/promoter activity und IE protein synthesis in these cell lines. The effects followed a characteristic kinetics over time: highest stimulation rates were seen with milk whey collected during the first and second week after delivery preceding the peak in viral load for 2-3 weeks. By using promoter mutants and inhibitors it could be demonstrated that stimulation of the IE1/2 enhancer/promoter is a multifactorial effect in which glucocorticoids play a significant role.

HCMV, preterm, breastfeeding, reactivation

## **Inhaltsverzeichnis**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Abstract deutsch</b>   | <b>3</b>  |
| <b>Abstract englisch</b>  | <b>4</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>                                      | <b>8</b>  |
| <b>1 EINLEITUNG</b>   | <b>10</b> |
| 1.1 Die Familie der Herpesviridae                                 | 10        |
| 1.2 Das Humane Cytomegalievirus (HCMV)                            | 10        |
| 1.3 Morphologie und Genomstruktur von HCMV                        | 11        |
| 1.3.1 Morphologie   | 11        |
| 1.3.2 Genomstruktur   | 12        |
| 1.4 Genomexpression und der Immediate Early 1/2-Enhancer/Promotor | 13        |
| 1.4.1 Genomexpression   | 13        |
| 1.4.2 Der Immediate Early 1/2-Enhancer/Promotor                   | 13        |
| 1.5 Epidemiologie, Übertragung und Klinik der HCMV-Infektion      | 15        |
| 1.5.1 Allgemeines   | 15        |
| 1.5.2 Kongenitale HCMV-Infektion                                  | 16        |
| 1.5.3 Peri/postnatale HCMV-Infektionen                            | 17        |
| 1.5.4 HCMV-Infektionen im Erwachsenenalter                        | 18        |
| 1.6 Latenz und Reaktivierung von HCMV                             | 20        |
| 1.6.1 Mechanismus und Ort der Latenz                              | 20        |
| 1.6.2 Mechanismen der HCMV-Reaktivierung                          | 21        |
| 1.7 Fragestellung der Arbeit                                      | 23        |
| <b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>                                    | <b>25</b> |
| 2.1 Zelllinien  | 25        |
| 2.1.1 Monozytäre Zelllinien HL-60 und THP-1                       | 25        |
| 2.1.2 Humane embryonale Lungenfibroblasten (HELFL)                | 25        |
| 2.2 Virus   | 25        |
| 2.3 Plasmide  | 26        |

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| <b>2.4</b>  | <b>Hormone, Zytokine, Hemmstoffe</b>   | <b>27</b> |
| <b>2.5</b>  | <b>Patienten und Patientenmaterial</b>   | <b>27</b> |
| 2.5.1       | Patienten  | 27        |
| 2.5.2       | Gewinnung von Muttermilch und zellfreier Molke   | 28        |
| 2.5.3       | Gewinnung von Urin, Trachealaspiraten und Pharyngealsekreten   | 28        |
| 2.5.4       | Serum und Periphere Blutmonozyten (PBMC)   | 28        |
| <b>2.6</b>  | <b>Statistik</b>   | <b>29</b> |
| <b>2.7</b>  | <b>DNA-Isolierung und Polymerase Kettenreaktion</b>  | <b>29</b> |
| 2.7.1       | DNA-Isolierung   | 29        |
| 2.7.2       | Polymerase Kettenreaktion (PCR)  | 29        |
| <b>2.8</b>  | <b>Transfektion monozytärer Zellen</b>   | <b>31</b> |
| 2.8.1       | DEAE-Dextranmethode  | 31        |
| 2.8.2       | Elektroporation  | 31        |
| <b>2.9</b>  | <b>Gewinnung von Zelllysaten und CAT-Assay</b>   | <b>32</b> |
| 2.9.1       | Ernte der Zellen und Gewinnung der Zelllysate  | 32        |
| 2.9.2       | Proteinbestimmung der Zelllysate   | 32        |
| 2.9.3       | CAT-Assay  | 33        |
| <b>2.10</b> | <b>Plaque Test und immunzytochemische Färbung HCMV-infizierter Zellen</b>  | <b>33</b> |
| 2.10.1      | Standard– Plaque Test  | 34        |
| 2.10.2      | Immunzytochemische Färbung HCMV-infizierter Zellen   | 34        |
| <b>2.11</b> | <b>Western Blot Analysen</b>   | <b>34</b> |
| 2.11.1      | Infektion der HELF-Kulturen  | 35        |
| 2.11.2      | Western Blot Analysen  | 36        |
| <b>3</b>    | <b>ERGEBNISSE</b>  | <b>38</b> |
| <b>3.1</b>  | <b>Untersuchungen zur Inzidenz von HCMV-Reaktivierungen während der Laktation in der laktierenden Brust und zur Virustransmission auf das gestillte Frühgeborene</b> | <b>38</b> |
| 3.1.1       | Inzidenz von DNAktia und DNAemia in stillenden Müttern in den ersten beiden Monaten nach Entbindung  | 39        |
| 3.1.2       | Untersuchungen zur Inzidenz der HCMV Übertragung auf das Frühgeborene  | 42        |
| 3.1.3       | HCMV-Infektionen der Frühgeborenen   | 43        |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| <b>3.2</b> | <b>Einfluss von Molke auf die Virusreplikation und IE 1/2-Proteinsynthese in HCMV-infizierten HELF</b>                                    | <b>47</b>  |
| 3.2.1      | Effekt von Molke auf die HCMV-Replikation in HELF   | 47         |
| 3.2.2      | Effekt von Molke auf die HCMV-Immediate Early Proteinsynthese   | 50         |
| <b>3.3</b> | <b>Einfluss von Molke auf die Aktivität des HCMV IE1/2-Enhancer/Promotors in HL-60 und THP-1 Zellen</b>                                   | <b>53</b>  |
| 3.3.1      | Einfluss von Molke auf die Aktivität des HCMV IE1/2-Enhancer/Promotor in HL-60 und THP-1 Zellen   | 53         |
| 3.3.2      | Kinetik der Stimulation des IE1/2-Enhancer/Promotors durch Molke stillender Mütter in den ersten Monaten der Laktation                    | 56         |
| <b>3.4</b> | <b>Untersuchungen zum Mechanismus der Molke-vermittelten Stimulierung des HCMV IE1/2-Enhancer/Promotors</b>                               | <b>60</b>  |
| 3.4.1      | Untersuchungen zur Rolle von Glukokortikoiden im Prozess der molkevermittelten HCMV IE1/2-Enhancer/Promotorstimulation in HL-60 Zellen    | 60         |
| 3.4.2      | Untersuchung zur Rolle von TNF $\alpha$ und cAMP im Prozess der molkevermittelten HCMV IE1/2-Enhancer/Promotorstimulation in HL-60 Zellen | 63         |
| 3.4.3      | Einfluss von humanem Prolaktin und Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) auf die Aktivität des HCMV IE1/2-Enhancer/Promotors in HL-60 Zellen  | 65         |
| <b>4</b>   | <b>DISKUSSION</b>   | <b>67</b>  |
| 4.1        | HCMV-Reaktivierung in stillenden Müttern und Übertragung auf Frühgeborene   | 67         |
| 4.2        | Einfluss von Muttermilch auf die Reaktivierung und Replikation von HCMV   | 76         |
| <b>5</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b>  | <b>87</b>  |
| <b>6</b>   | <b>Literaturverzeichnis</b>   | <b>90</b>  |
|            | <b>Anhang</b>   | <b>104</b> |
|            | <b>Eigene Veröffentlichungen</b>  | <b>104</b> |
|            | <b>Lebenslauf</b>   | <b>105</b> |
|            | <b>Danksagung</b>   | <b>106</b> |
|            | <b>Erklärung</b>  | <b>107</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                |  |
|----------------|--|
| • ATF          | activating transcription factor            |
| • AIDS         | acquired immunodeficiency syndrome         |
| • BPD          | Bronchopulmonale Dysplasie                 |
| • cAMP         | cyklisches Adenosinmonophosphat            |
| • CAT          | Chloramphenicol-Acetyl-Transferase         |
| • CMV          | Cytomegalievirus                           |
| • CPE          | Cytopathischer Effekt                      |
| • CREB         | cAMP-responsive element binding protein    |
| • E            | early                                      |
| • EBV          | Epstein Barr Virus                         |
| • EDTA         | Ethylendinitrioltetraessigsäure            |
| • EGF          | epidermal growth factor                    |
| • EMSA         | electrophoretic mobility shift assay       |
| • FKS          | Fetales Kälberserum                        |
| • HCMV         | Humanes Cytomegalie Virus                  |
| • HELF         | Humane embryonale Lungenfibroblasten       |
| • HHV          | Humanes Herpesvirus                        |
| • HIV          | Humanes Immunodeficiency Virus             |
| • HSV          | Herpes Simplex Virus                       |
| • GI           | Gastrointestinal                           |
| • GR           | Glukokortikoid Rezeptor                    |
| • GRE          | glucocorticoid-receptor responsive element |
| • ICAM         | intercellular adhesion molecule            |
| • IE           | immediate early                            |
| • IgM          | Immunglobulin M                            |
| • IgG          | Immunglobulin G                            |
| • IFN $\gamma$ | Interferon gamma                           |
| • I $\kappa$ B | Inhibitor Kappa B                          |
| • IL           | Interleukin                                |
| • inf.         | infiziert                                  |
| • kbp          | Kilobasenpaar                              |
| • kDa          | Kilodalton                                 |



|          |   |
|----------|---|
| • L      | late  |
| • MBF    | modulator binding factor                                      |
| • m.o.i. | multiplicity of infection                                     |
| • NFκB   | nuclear factor Kappa B  |
| • ORF    | open reading frame  |
| • PBMC   | peripheral blood monocytic cells                              |
| • PBS    | phosphate buffered saline                                     |
| • PCR    | Polymerase Kettenreaktion                                     |
| • PGE    | Prostaglandin E   |
| • PRL    | Prolaktin   |
| • PS     | Pharyngealsekret  |
| • RANTES | regulated on activation, normal T cell expressed and secreted |
| • RDS    | respiratory distress syndrome                                 |
| • ROP    | Retinopathia praematurorum                                    |
| • Rpm    | rounds per minute   |
| • SP1    | stimulating protein 1   |
| • SP-A   | surfactant protein A  |
| • SSW    | Schwangerschaftswoche   |
| • STAT   | signal transducer and activator of transcription              |
| • TBE    | Tris-Borat-EDTA   |
| • TGFβ   | transforming growth factor beta                               |
| • TNFα   | Tumor Nekrose Faktor Alpha                                    |
| • TS     | Trachealsekret  |
| • uninf. | nicht infiziert   |
| • YY1    | Ying-Yang 1   |

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Familie der Herpesviridae

Infektionen mit Viren der Familie der Herpesviridae sind sowohl bei Wirbeltieren als auch beim Menschen weit verbreitet. Von über 100 Herpesviren gelten allerdings nur neun als humanpathogen. Hierzu zählen die Herpes Simplex Viren Typ 1 und 2 (HSV-1/2), das Varicella Zoster Virus (VZV), das Epstein Barr Virus (EBV), die Humanen Herpesviren 6a, 6b, 7 und 8 (HHV-6/7/8), sowie das Humane Cytomegalievirus (HCMV). Infektionen mit diesen Viren führen zu einem breiten Spektrum von Erkrankungen. Es reicht vom lokal begrenzten bläschenförmigen Hautausschlag der Herpes Simplex Viren, über generalisierte Manifestationen bei Windpocken (VZV), lebensbedrohliche Pneumonien Immungeschwächter durch HCMV (siehe Kap. 1.5.4.) bis hin zur Beteiligung von Herpesviren an der Entstehung von Tumorerkrankungen (EBV, HHV-8).

Eine charakteristische Eigenschaft aller Herpesviren ist ihre Fähigkeit, nach oftmals subklinisch verlaufender Primärinfektion in ein latentes Stadium überzugehen. In diesem vor der Immunabwehr geschützten Zustand kann das Virus lebenslang im Organismus persistieren. Unter bestimmten Einflüssen können Herpesviren aus der Latenz reaktiviert werden (siehe Kap. 1.6.2). Als Folge kommt es zu Erkrankungen mit oft gänzlich neuer Symptomatik. In ihrem morphologischen und genomischen Aufbau zeigen die einzelnen Vertreter der Herpesviren grundlegende Gemeinsamkeiten (siehe Kap. 1.3.). Aufgrund ihrer unterschiedlichen biologischen Eigenschaften –wie Pathogenität, Vermehrungszyklus sowie Wirts- und Zellspezifität - werden sie in die drei Unterfamilien der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ - Herpesvirinae unterteilt.

## 1.2 Das Humane Cytomegalievirus (HCMV)

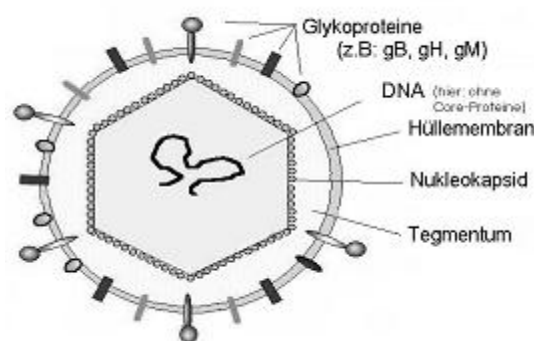
Das Humane Cytomegalievirus ist der wichtigste Vertreter der  $\beta$ -Herpesviren. Es zeichnet sich durch eine strenge Wirtsspezifität und einen langsamen Replikationszyklus von 48-72 Stunden aus. Vom Virus infizierte Zellen erscheinen vergrößert, runden sich ab und zeigen typische Einschlusskörperchen. Dieser auffällige cytopathische Effekt (CPE) war es, der Forscher auf das Virus aufmerksam machte und später zu seiner Namensgebung führte (griech.: kytos= Zelle; megas= groß). Anfang des 20. Jahrhunderts beobachtete der Pathologe Jesionek erstmals diese typisch aufgeblähten Zellen in Lungen-, Leber- und Milzmaterial von Todgeburten (Jesionek et al., 1904). Die zugrundeliegende Krankheit wurde als kongenitales Cytomegalie-Einschluss-Syndrom („Cytomegalic inclusion body disease“) bezeichnet. Jesionek hielt eine Besiedlung mit

Protozoen für die Verursacher der typischen Zellveränderungen. Erstmals 1925 wurde eine virologische Ätiologie postuliert (von Glahn et al., 1925). Es dauerte aber weitere drei Jahrzehnte, bis das infektiöse Agens erstmalig im Elektronenmikroskop als Viruspartikel identifiziert (Minder et al., 1953) und schließlich 1956/57 nahezu zeitgleich in drei Laboren isoliert werden konnte (Rowe et al., 1956; Smith et al., 1956; Weller et al., 1957). Nun war es möglich, das Virus zu diagnostischen Zwecken zu kultivieren und seine Natur durch *in vitro* Experimente genauer zu erforschen. Stern und Friedman (Stern et al., 1960) zeigten bald darauf, dass es sich bei den beobachteten Einschlusskörperchen im Zytoplasma um Produkte der im Kern stattfindenden Virusreplikation handelt. Durch neue Methoden wurde klar, dass verschiedene HCMV Genotypen existieren und dass in immunsupprimierten Patienten unterschiedliche Genotypen gleichzeitig gefunden werden können (Baldanti et al., 1998; Chou et al., 1989; Gerna et al., 1992). Versuche, einzelne Genotypen (z.B. Subtypen des Glykoproteins B) bestimmten charakteristischen klinischen Infektionsverläufen zuzuordnen, zeigten allerdings keine eindeutigen Zusammenhänge. Eine Einteilung in HCMV-Subtypen existiert daher nicht (Fries et al., 1994; Vogelberg et al., 1996).

### 1.3 Morphologie und Genomstruktur von HCMV

#### 1.3.1 Morphologie

Die Struktur von HCMV-Virionen entspricht dem typischen Aufbau der Herpesviren (siehe Abb. 1).



**Abb. 1: Strukturschema des HCMV**

Das reife Viruspartikel hat einen Durchmesser von 150 – 200 nm. In seinem Inneren befinden sich das Virus-Core, eine fibrilläre Nukleoproteinmatrix, mit der das doppelsträngige, lineare DNA Genom assoziiert ist. Es wird von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben.

Zwischen Kapsid und äußerer Virushülle („envelope“) liegt das elektronendichte, hauptsächlich aus Phosphoproteinen bestehende Tegument. Die beiden häufigsten Tegumentproteine (pp65, pp150) stellen ein wichtiges Antigen target in der HCMV-Schnelldiagnostik dar, für andere Tegumentproteine (z.B. pp71, pUL26) konnten transaktivierende Wirkungen auf die virale Genexpression nachgewiesen werden (Liu et al., 1992; Stamminger et al., 2002). In der alles umschließenden Virushülle, die aus einer Lipid-Doppelmembran besteht, sind virale Glykoproteine stecknadelförmig eingelassen, die im Elektronenmikroskop als „spikes“ sichtbar werden. Sie dienen u.a. der Rezeptorerkennung und Adsorption des Virus. Ihre starke Immunogenität macht sie zur favorisierten Zielstruktur in der Impfstoffentwicklung (Griffiths et al., 2002). Bedingt durch seine Struktur ist HCMV empfindlich gegenüber niedrigem pH, Lipidlösungsmittel und Hitze. Kälte von  $-20^{\circ}\text{C}$  konserviert das Virus, zur sicheren Erhaltung der Infektiosität ist allerdings eine Lagerung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  erforderlich (Mocarski et al., 2001).

### 1.3.2 Genomstruktur

Das HCMV Genom gehört mit ca. 230 kbp und etwa 200 ORFs zu den größten viralen Genomen. Es ist in zwei unikale Segmente – ein langes Segment ( $U_L$ ) und ein kurzes Segment ( $U_S$ ) unterteilt (Abb. 2). Diese werden am Ende durch terminale repetitive Sequenzen flankiert ( $TR_S$ ,  $TR_L$ ) und in der Mitte durch interne repetitive Sequenzen ( $IR_L$ ,  $IR_S$ ) verbunden. Da die unikalen Segmente invertieren können, kommt das humane CMV (im Gegensatz zu tierpathogenen CMV-Stämmen, denen interne Repeats fehlen) in 4 verschiedenen Isomeren vor (Ho et al., 1991).

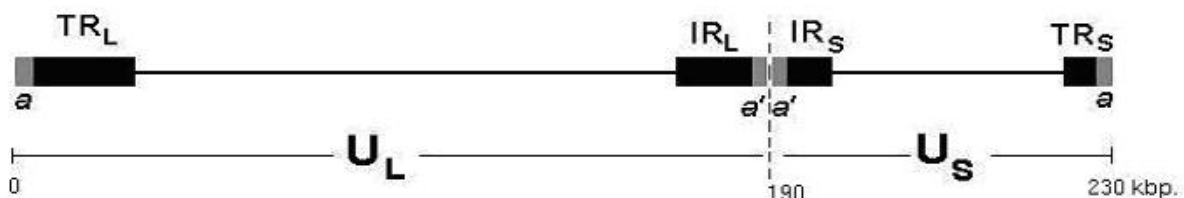


Abb. 2: Genomstruktur von HCMV. Erläuterungen im Text (Ho et al., 1991)

## **1.4 Genomexpression und der Immediate Early 1/2-Enhancer/Promotor**

### **1.4.1 Genomexpression**

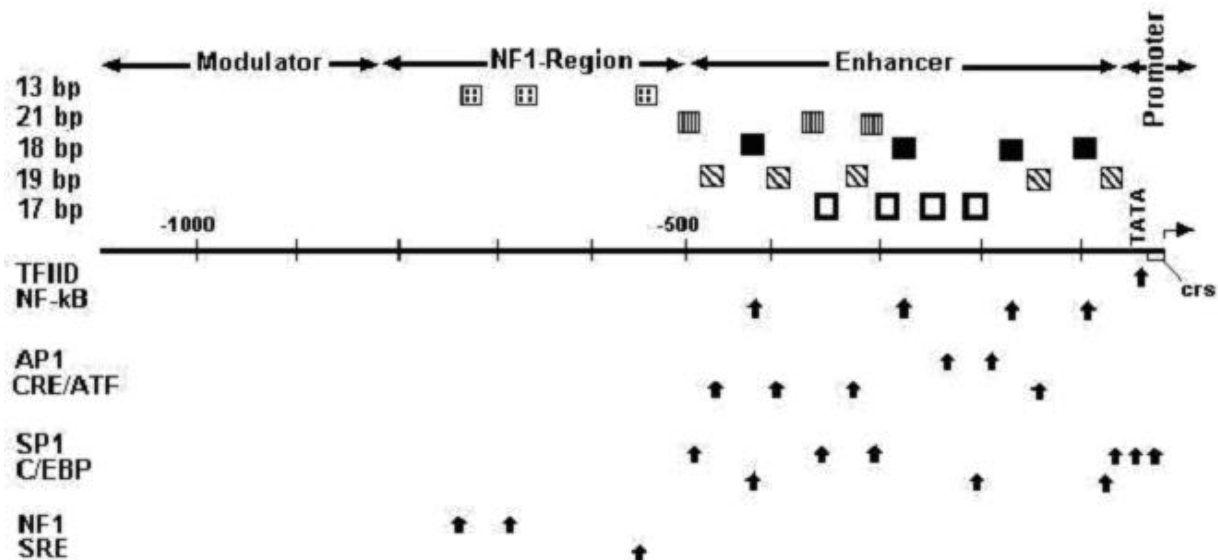
Nach Wanderung des Nukleokapsids in den Kern der infizierten Zelle erfolgt hier die Transkription viraler Gene mit Hilfe der zellulären RNA Polymerase II in einem zeitlich streng kontrollierten Ablauf: kaskadenartig werden „sehr frühe“ (Immediate Early [IE]), „frühe“ (Early [E]) und „späte“ (Late [L]) Proteine von entsprechenden  $\alpha$ -Genen (IE),  $\beta$ -Genen (E) und  $\gamma$ -Genen (L) in zeitlicher Reihenfolge transkribiert. Der Grossteil der IE-Transkripte stammt aus einem stark exprimierten „major IE Locus“, der sich zwischen den Positionen 169 und 175 kbp des HCMV Genoms befindet. Die Synthese der wichtigen hier kodierten Proteine IE1 (72 kDa) und IE2 (86 kDa) beginnt bereits zwei Stunden nach Infektion, ist unabhängig von einer de novo Synthese zellulärer Proteine und absolut essentiell für die folgende Virusreplikation (Mocarski et al., 2001). Die IE1 und IE2 Proteine haben transaktivierende Wirkung auf die Expression „früher“ und „später“ Gene, und können ihre eigene Synthese positiv (IE1) oder negativ (IE2) regulieren (Malone et al., 1990). Die Haupt-IE-Proteine greifen zudem in Zellzyklus- und Wachstumskontrollmechanismen des Wirtes ein. Ihnen kommt daher eine besondere Bedeutung für den Beginn der viralen Replikation nach Infektion und den Prozess der Reaktivierung zu (siehe Kapitel 1.6.2.). Die zeitlich nachfolgend exprimierten  $\beta$ -Gene kodieren vorwiegend für virusspezifische Enzyme, die für den DNA- Metabolismus und Replikationsprozess benötigt werden und die Expression der  $\gamma$ -Gene steigern. Durch letztere werden ausschließlich virale Strukturproteine exprimiert, die für Zusammenbau und Ausschleusung infektiöser Viruspartikel von Bedeutung sind.

### **1.4.2 Der Immediate Early 1/2-Enhancer/Promotor**

Die Regulation der Haupt-IE-Gene erfolgt durch einen außergewöhnlich starken IE1/2-Enhancer/Promotor (Boshart et al., 1985). Dieser Promotor ist essentiell für eine effiziente Virusreplikation (Isomura et al., 2003). Er enthält eine für die Initiation der Transkription nötige TATA-Box, sowie eine CAAT-Box, über die spezifische Proteine die Transkription nachgeschalteter Gene erhöhen können. Darüber hinaus wird die Aktivität des Promotors im besonderen Maße von drei stromaufwärts liegenden Regionen reguliert: dem „Enhancer“, der „Nuclear factor 1-“ und der „Modulatorregion“.

Wie Abbildung 3 zeigt, liegen in allen drei Regionen repetitive Bindungsorte für zelluläre Transkriptionsfaktoren. Die Modulatorregion kann durch Bindung der Transkriptionsfaktoren „Ying-Yang 1“ (Liu et al., 1994) und Modulator binding Factor 1 eine hemmende Wirkung auf

die Promotoraktivität ausüben. Den in der „nuclear factor-Region“ (Adam et al., 1987) angesiedelten „konsensus binding sites“ für Proteine der NF1/CBP- (CAAT-binding protein) Familie kommen sowohl negative als auch positive regulatorische Eigenschaften zu (Mocarski et al., 2001).



**Abb. 3: Schematische Struktur der Haupt-IE 1/2-Promotorregion**  
Die repetitiven Sequenzen im HCMV IE1/2-Enhancer/Promotor sind als (21-bp Repeat), (19-bp Repeat), (18-bp Repeat), (17-bp Repeat) und (13-bp Repeat) dargestellt, die an sie bindenden Transkriptionsfaktoren (links) wurden durch Pfeile zugeordnet. (Mocarski et al., 2001)

Die Enhancerregion spielt die weitaus entscheidendste Rolle in der Regulation der Promotoraktivität. Sie enthält zahlreiche repetitive und unikale Bindungsstellen für verschiedene zelluläre Transkriptionsfaktoren. Diese Bindungsstellen werden jeweils nach ihrer Größe als „17-, 18-, 19-, und 21 bp repeats“ bezeichnet.

Bindung von YY1 und MBF1 an die 21 bp repeats führen zu einer Hemmung der Promotoraktivität. Die Synthese beider Transkriptionsfaktoren nimmt mit fortschreitender Zelldifferenzierung ab (Liu et al., 1994), was ein Hinweis darauf sein könnte, dass diese Transkriptionsfaktoren an der Etablierung und Aufrechterhaltung der Latenz beteiligt sind (siehe Kap.1.6.2.). Die fünf 19 bp Motive sind u.a. für die promotorstimulierende Wirkung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und Katecholaminen verantwortlich (Keller et al., 2003; Prösch et al., 2000 a). Sie enthalten „cAMP responsive elements“, die den durch erhöhte cAMP-Spiegel aktivierten Transkriptionsfaktor CREB1/ATF1 binden (Hunninghake et al., 1989). Lange wurde dieser Sequenz eine wesentliche Rolle für die basale Grundaktivität des IE-Promotors zugeschrieben (Stamminger et al., 1990), neuere Untersuchungen an entsprechenden Virusmutanten stellen dies jedoch wieder in Frage (Keller et al. 2003).

Die 18 bp Repeats sind Bindungsstellen für den Nuclear Factor Kappa B (NFκB) (Prösch et al., 1995; Sambucetti et al., 1989). Dieser liegt inaktiv gebunden an den Inhibitor Kappa B (IκB) im Cytosol. Insbesondere bei entzündlichen Prozessen induzieren Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor Alpha (TNFα) oder Interleukin-1 (IL-1) über die Aktivierung von Sauerstoffradikalen und Erhöhung der Proteinkinase C –Aktivität eine Phosphorylierung von IκB. Diese hat zur Folge, dass IκB durch Proteasomen abgebaut wird und der aktive NFκB-Komplex in den Zellkern transloziert (McKay et al., 1999). Über Bindung an das 18 bp Repeat im HCMV IE1/2-Enhancer führt NFκB zu einer potenten Stimulierung der Promotoraktivität in monozytären HL-60 und U-937 Zellen (Prösch et al., 1995; Stein et al., 1993). Sowohl das 18-, wie auch das 19 bp Repeat sind konservierte Sequenzen, die auch bei tierpathogenen CMV Stämmen zu finden sind (Hunninghake et al., 1989); nicht aber das 17 bp Repeat. Ihm wurde daher lange keine große Bedeutung beigemessen. An ihn binden die Transkriptionsfaktoren NF1 und das „stimulating Protein 1“ (SP1), ein ubiquitäres Kernprotein. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch die stimulierende Wirkung von Glukokortikoiden auf den HCMV IE1/2-Enhancer/Promotor über ein in dieser 17 bp Sequenz gelegenen Glucocorticoid receptor responsive elements (GRE) vermittelt wird (Prösch et al., eingereicht).

## **1.5 Epidemiologie, Übertragung und Klinik der HCMV-Infektion**

### **1.5.1 Allgemeines**

Infektionen mit HCMV sind weltweit verbreitet, die Seroprävalenzen in verschiedenen Ländern variieren in Abhängigkeit vom sozioökonomischen Standard des Landes (Pass et al., 2001). So liegt die Prävalenz spezifischer HCMV-Antikörper in Industrienationen wie Amerika, Europa und Australien bei 40-70% der Bevölkerung und damit deutlich niedriger als in Nationen in Afrika und Asien, für die Seroprävalenzen im Erwachsenenalter von 85-100% beschrieben werden (Hirota et al., 1992; Krech et al., 1973; Lamberson et al., 1992). Nach erfolgter Primärinfektion kann es zu sporadischen HCMV-Reaktivierungen kommen, bei denen infektiöses Virus in Speichel, Urin, Tränen, Blut, Samenflüssigkeit, Zervikalsekreten und Muttermilch für einen Zeitraum von Monaten bis Jahren ausgeschieden wird (Lang et al., 1975; Reynolds et al., 1973; Stagno et al., 1975). Die Seroprävalenzen steigen mit fortschreitendem Alter insbesondere innerhalb zweier Altersgruppen durch horizontale Ausbreitung: Bei Kinder bis zum 5. Lebensjahr und im frühen Erwachsenenalter. Enger körperlicher Kontakt durch Eltern und Personal in Kindergärten sowie untereinander (Kind - Kind) wird für den ersten Anstieg, der

Beginn sexueller Kontakte für den zweiten verantwortlich gemacht (Carlström et al., 1970; Stagno et al., 1994). Auch eine vertikale Infektionsausbreitung von der Mutter zum Kind ist möglich, da das Virus insbesondere bei Primärinfektion während der Schwangerschaft die Plazentaschranke überwinden und das ungeborene Kind infizieren kann (siehe Kap. 1.5.2.).

### **1.5.2 Kongenitale HCMV-Infektion**

Nach erfolgreicher Zurückdrängung von Röteln-Infektionen während der Schwangerschaft ist das Krankheitsbild der „cytomegalic inclusion disease“, hervorgerufen durch kongenitale HCMV-Infektionen, heute die häufigste pränatal übertragene Infektionskrankheit. Je nach Population werden 0,2 - 2,2 % aller Neugeborenen auf diesem Wege infiziert (Peckham et al., 1991; Stagno et al., 1983; Vochem et al., 2003). Zu einer Übertragung kann es in jedem Schwangerschaftstrimester, sowohl bei Primärinfektion, Reinfektion oder Virus-Reaktivierung der Mutter kommen (Ahlfors et al., 1999; Griffiths et al., 2002). Eine fetale Infektion nach Primärinfektion der Mutter ist am häufigsten (in 1/3 der Fälle) und resultiert deutlich öfter in Spontanaborten, Frühgeburten und schwereren Krankheitsverläufen als bei Reinfektionen oder Virusreaktivierungen (Stagno et al., 1986). Der Großteil der Infektionen verläuft klinisch inapparent. Jedes 10. infizierte Neugeborene zeigt jedoch bereits bei Geburt schwere Akutsymptome wie Hepatosplenomegalie, Thrombozytopenie, Petechien, Mikrozephalie, Wachstumsstörung, Chorioretinitis, andauernder Ikterus, in seltenen Fällen auch Pneumonie. Vorsichtige Schätzungen gehen von einer Letalitätsrate von 10-30 % der symptomatisch infizierten Kinder aus (Newell et al., 2000). Neben diesen Akutsymptomen verursacht die kongenitale HCMV-Infektion Spätschäden im Bereich des zentralen und peripheren Nervensystems. Bis zu 12 % der bilateralen Innenohrschwerhörigkeit werden pränatalen Infektionen mit HCMV zugeschrieben (Peckham et al., 1987) und die Inzidenz von mentalen Entwicklungsstörungen, cerebralen Verkalkungen und Atrophien der Nervi optici korreliert eindeutig mit dem Auftreten kongenitaler HCMV-Infektionen (Anderson et al., 1996; Pass et al., 1980; Ramsey et al., 1991). Die Kosten für Pflege und Betreuung der so erkrankten Kinder wird in den USA auf eine Billion Dollar pro Jahr geschätzt (Stratton et al., 2000) -ein Grund, warum seit langem an einem Impfstoff gearbeitet wird, der durch humorale Immunität der Mütter die Zahl schwerwiegender kongenitaler Infektionen reduzieren soll.

Der Mechanismus, durch den das Virus den Fetus infiziert, ist noch ungeklärt. Plazentäre Cytotrophoblasten bilden die Barriere zwischen maternalem und fetalem Blutkreislauf. Im



Abortmaterial konnte in 7-30 % des untersuchten Materials HCMV-DNA nachgewiesen werden (Pereira et al., 2003; Spano et al., 2002). Immunohistochemische Untersuchungen an HCMV-infizierten Plazenten zeigten Viruspermissivität für plazentare Endothelzellen und Trophoblasten (Sinzger et al., 1993). Dabei muss es nicht zwingend auch zu einer Infektion des Fetus kommen, wenn plazentäres Gewebe infiziert ist (Hayes et al., 1971). Fallbeschreibungen berichten sogar von biplazentären Zwillingsschwangerschaften, bei denen beide Plazenten, jedoch nur einer der Feten infiziert wurde (Revello et al., 2003). *In vitro* Infektionen zeigten eine Virustransmission von uterinen Endothelzellen zu plazentären Cytotrophoblasten (Maidji et al., 2002). Es wird daher zur Zeit ein Transmissionsmodell diskutiert, in dem zunächst die Plazenta über uterine Endothelzellen produktiv infiziert wird, das Virus von hier über plazentäre Synzytio- und Cytotrophoblasten Anschluss an Endothelzellen des fetalen Blutkreislaufs erhält, um sich schließlich hämatogen im Fetus auszubreiten (Maidji et al., 2002).

### **1.5.3 Peri/postnatale HCMV-Infektionen**

Von „perinatalen HCMV-Infektionen“ spricht man beim initialen Nachweis von Virus innerhalb der ersten 2 Wochen nach Geburt im Urin, bei zunächst negativen Befund direkt nach der Geburt (Ho et al., 1991). Die Infektion des Kindes geschieht hierbei im Zeitraum vom Beginn der Wehen bis 1 Woche nach Geburt.

Postnatale Infektionen sind Infektionen die nach der 1. Lebenswoche das Neugeborene befallen. Sie können erst nach ausreichender Virusvermehrung etwa ab der 3. Lebenswoche durch Virusnachweis beim Kind diagnostiziert werden.

Insbesondere zwei Übertragungsmodi werden für peri/postnatale Infektionen mit HCMV diskutiert: Kontakt mit infiziertem mütterlichem Zervikalsekret oder Blut unter der Geburt und Aufnahme von infizierter Muttermilch.

Bei Virusausscheidung im Zervikalsekret der Mutter um den Geburtstermin resultierte nach einer Studie in den USA eine Mutter-Kind Übertragungsrate von 57 %. Virusausscheidung in Urin und Speichel alleine führte hingegen zu keiner Infektion des Kindes (Stagno et al., 1980). Neuere Untersuchungen konnten diese hohe Übertragungsrate über infizierte mütterliche Zervikalsekreten nicht bestätigen, ihre Ergebnisse stellten die Rolle der Muttermilch als Übertragungsmedium wieder in den Vordergrund. So fanden sich bei 63-76 % seropositiver Mütter infektiöses Virus (Virolaktia) (Ahlfors et al., 1985; Hamprecht et al., 2001; Mosca et al., 2001) und in sogar 92-96% virale DNA in der Milch (DNA-laktia) (Hamprecht et al., 2001;

Hotsubo et al., 1994; Meier et al., 2005; Yasuda et al., 2003). In diesen Studien wurde über eine postnatale Transmissionsrate von 19-37 % der Kinder von seropositiven Müttern berichtet. Die Übertragungsraten waren vergleichbar in der Gruppe von Spontangeburt und Kaiserschnitt-Entbindungen, wo kein Kontakt zu potentiell infiziertem Zervikalsekret bestand. Dieser Befund ist ein starker Hinweis auf postnatale Übertragung von HCMV über Muttermilch. In der neuesten Studie von Hamprecht et al. (2001) konnte darüber hinaus kein Virus in mütterlichen Rachenabstrichen und Urinproben nachgewiesen werden. Im Unterschied dazu zeigen die Daten, dass es in nahezu allen seropositiven Müttern zu einer Reaktivierung und Ausscheidung des Virus zu Beginn der Laktation mit der Brustmilch kommt. Da es hierbei keine Anzeichen einer systemischen Virusinfektion der Mutter gibt, scheint dieser Reaktivierungsprozess lokal auf die Brust begrenzt zu sein. Virus wird nur selten in Kolostrum (Vormilch) gefunden (Numazaki et al., 1997). Die gemessene Viruslast ist am höchsten zwischen der 3. und 6. Woche post partum (van der Strate et al., 2001; Vochem et al., 1998; Yasuda et al., 2003). Das Virus erscheint in der Milch häufiger zellfrei als zellassoziiert an Leukozyten (Hamprecht et al., 2000). Der genaue Übertragungsmechanismus und der mögliche Latenzort sind noch unbekannt.

Während peri/postnatale HCMV-Infektionen bei gesunden Neugeborenen in der Regel asymptomatisch verlaufen, werden bei „sehr kleinen Frühgeborenen“ ( $\leq 1500$  gr,  $\leq 32$ . Gestationswoche) häufiger auch klinische Infektionsverläufe beobachtet. Symptomatische HCMV-Erkrankungen wurden in bis zu 12 % der so infizierten Frühgeborenen mit den typischen Hepatopathien, Thrombozytopenien, Pneumonien und sepsisartigen Krankheitsbildern beschrieben (Hamprecht et al., 2001).

#### **1.5.4 HCMV-Infektionen im Erwachsenenalter**

HCMV-Infektionen des Erwachsenen zeigen je nach Immunstatus des Betroffenen sehr unterschiedliche klinische Bilder:

Bei immunkompetenten Patienten verläuft die Primärinfektion in den meisten Fällen gänzlich asymptomatisch. Nach einer Inkubationszeit von 2-8 Wochen kann es in seltenen Fällen zu einer der EBV-assoziierte Mononukleose ähnlichen Erkrankung kommen. Sie ist durch grippale Symptome mit hohem Fieber, Abgeschlagenheit, Gliederschmerzen und rubelliformen Hautausschlag charakterisiert. Bei Verursachung durch HCMV findet man jedoch nur in 30 % der Fälle die für die EBV assoziierte Mononukleose typische Pharyngitis, Lymphadenopathie

und Splenomegalie (Pass et al., 2001). Das Krankheitsbild der HCMV assoziierten Mononukleose ist selbstlimitierend und ebbt in der Regel nach 2-6 Wochen ab.

Viel schwerwiegendere Folgen haben HCMV- Infektionen für immunsupprimierte Patienten, insbesondere in der Transplantations-Medizin und bei HIV-Kranken. Hier kann es zu schweren symptomatischen Primärinfektionen, Reinfektionen und Reaktivierungen kommen. Nahezu alle HIV-infizierten Personen sind HCMV-seropositiv. Im Stadium AIDS breitet sich das Virus in fast alle Organe aus und verkompliziert den Krankheitsverlauf. Am häufigsten befällt es das Auge und führt zu einer HCMV-Retinitis, welche die vollständige Erblindung des Patienten zur Folge haben kann (Jabs et al., 1989). Die Entwicklung einer Ösophagitis und ulcerierender Kolitis wird bei jedem 10. HIV-Patienten beobachtet. Etwas seltener aber mit schwerwiegenden Konsequenzen kommt es zu HCMV-Pneumonien, Encephalitiden, Gastritiden und Hepatitiden. Eine gegenseitige Replikationssteigerung von HIV-1 und HCMV auf Promotorebene kann den Krankheitsverlauf beider Infektionen zudem verschlimmern (Pass et al., 2001).

Bei Transplantat-Empfängern sind eine erhöhte Morbidität und Letalität durch HCMV bekannt (Rubin et al., 1990). Unbehandelt entwickelten etwa 2/3 der Transplantatempfänger eine mehr oder weniger schwer verlaufende HCMV-Infektion (Nachweis von Virus-DNA und -Antigen ohne Organmanifestation) Insbesondere seronegative Empfänger von Knochenmarks-, Nieren- oder Lebertransplantaten seropositiver Spender entwickeln aber in 15 % der Fälle auch schwere Pneumonien und Colitiden, sowie Funktionsstörungen des Transplantats. Aus ersten klinischen und tierexperimentellen Studien gibt es Hinweise, dass HCMV direkt an der Transplantatabstoßung beteiligt ist (Reinke et al., 1994; Soderberg-Naucler et al., 2001).

Die Assoziation weiterer Krankheiten mit HCMV-Infektionen wird diskutiert. Klinische Studien lassen eine ursächliche Beteiligung von HCMV an der Entstehung von Atherosklerose und Koronararterien-Restenosen vermuten (Adam et al., 1987; Grattan et al., 1989; Hendrix et al., 1990; Melnick et al., 1983; Rubin et al., 1990). Experimentelle Daten unterstützen hierbei ein Pathogenesemodell, in dem HCMV die Proliferation glatter Muskelzellen beschleunigt, einen lokalen Inflamationsprozess mit Invasion von Monozyten induziert, der schließlich die Bildung von arteriosklerotischen Plaques begünstigt (Lemstrom et al., 1993; Li et al., 1998). Auf der Suche nach onkogenen Wirkungen von HCMV wurde eine Interaktion von IE-Proteinen mit zellzyklus-regulierenden Proteinen z.B. Rb und p53 beschrieben (Castillo et al., 2004). Virale DNA und Antigen wurden in Zervikal-, Prostata- und Kolonkarzinomen gefunden (Doniger et al., 1999; Samanta et al., 2003), wobei jedoch die Interpretation dieser Befunde durch die Omnipräsenz von HCMV und seine opportunistische Aktivität in tumorgeschwächten Patienten

problematisch ist. Eindeutige Anzeichen für eine klinisch relevante onkogene Wirkung von HCMV existieren derzeit nicht.

## 1.6 Latenz und Reaktivierung von HCMV

### 1.6.1 Mechanismus und Ort der Latenz

HCMV infiziert insbesondere muköse und duktale Epithelzellen, aber auch Endothelzellen, alveoläre Fibroblasten, Mikrogliazellen, dendritische Zellen und Pneumozyten. Nach Primärinfektion und Ausbreitung (lytischer Infektionszyklus) im Körper geht das HCMV in das Stadium der Latenz über, in dem es lebenslang im Organismus persistiert. Hierbei liegt das virale Genom in 3-13 Genkopien als extrachromosomales Episom in latent infizierten Zellen (Slobedman et al., 1999). In diesem Zustand ist es nur mit äußerst sensitiven PCR-Methoden und nach Anreicherung latent infizierter Zellen detektierbar (Larsson et al., 1998). Infektiöses Virus kann nicht nachgewiesen werden. Die virale Genexpression beschränkt sich auf einige wenige latenzassoziierte sense- und anti-sense Transkripte (LAT) der IE-Region. Ob diese eine Funktion in der Aufrechterhaltung der Latenz haben- so wie es für die LATs bei HSV diskutiert wird- ist bis heute unklar (Kondo et al., 1995; Lunetta et al., 2000).

Hämatopoetische Vorläuferzelllinien und die aus ihnen hervorgehende Monozyten/Makrophagen wurden als Hauptlatenzorte diskutiert und bestätigt. Zugrunde lag die Beobachtung, dass Bluttransfusionen seropositiver Spender in HCMV-negativen Empfängern eine Infektion hervorrufen können (Adler et al., 1985), wobei die Virusübertragung durch Verwendung Leukozyten-depletierten Blutes verhindert werden konnte (de Graan-Hentzen et al., 1989). Mittels hochsensitiver PCR Techniken wurde in CD33+ und CD34+ Vorläuferzellen des Knochenmarks und in weiter ausdifferenzierten CD14+ peripheren Blutmonozyten (PBMC) virale DNA nachgewiesen (Hahn et al., 1998; Kondo et al., 1996; Mendelson et al., 1996; Taylor-Wiedeman et al., 1991). Versuche, in denen permissive Zellen (Fibroblasten) mit *in vitro* infizierten Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen co-kultiviert wurden, zeigten, dass diese Zellen nicht nur DNA-Bruchstücke sondern intakte vermehrungsfähige Virusgenome enthalten. Ähnliche Experimente gelangen mit peripheren Blutmonozyten seropositiver Spender nach allogener Stimulierung (Hahn et al., 1998; Soderberg-Naucleer et al., 1997; Soderberg-Naucleer et al., 2001). In Anbetracht der Tatsache, dass Blutmonozyten *in vitro* keinen lytischen Replikationszyklus zulassen, jedoch DNA in PBMCs gesunder seropositiver - und sogar einiger weniger seronegativer- Patienten nachweisbar ist hat sich ein Latenzmodell durchgesetzt, in dem

hämatopoetische Vorläuferzellen des Knochenmarks nach Primärinfektion ein Reservoir für latentes Virus darstellen.

### 1.6.2 Mechanismen der HCMV-Reaktivierung

Absolute Voraussetzung für die HCMV-Reaktivierung ist der Wiederbeginn der IE-Genexpression (Greaves et al., 1998; Iskenderian et al., 1996). Hierfür werden verschiedenen Mechanismen diskutiert.

Zelldifferenzierungsprozesse: Bestimmte Zelllinien (z.B. monozytäre THP-1 und Ntera2-Karzinomazellen), die zunächst durch einen Block der IE-Genexpression keinen lytischen Replikationszyklus zulassen, können nach Weiterdifferenzierung infektiöses Virus bilden. Dieser Block wird wahrscheinlich durch zelluläre Transkriptionsfaktoren wie z.B. YY1, ERF und Oct-6 verursacht, welche die IE-Promotoraktivität und eine Verpackung der viralen DNA in deacetyliertes Histon (Nukleosomen) hemmen. Bei Zelldifferenzierung nimmt die Menge der hemmenden zellulären Transkriptionsfaktoren ab, während die Synthese aktivierender Transkriptionsfaktoren ansteigt. Eine ausreichende IE 1/2-Expression wird ermöglicht (Sissons et al., 2002). Nach dieser Theorie ist die Virusreaktivierung ein mehr oder weniger ständig erfolgreicher physiologischer Prozess, der bei ausreichender Immunabwehr lokal beschränkt bleibt, da die HCMV-tragenden Monozyten/Makrophagen zügig eliminiert werden.

Klinisch und experimentelle Daten belegen, dass systemische Entzündungen und extremer Stress zur Virusreaktivierung beitragen.

Bei systemischer Entzündung wie Psoriasis, Sepsis oder als Reaktion auf allogene Transplantation (unter Behandlung mit anti-Lymphozyten Antikörpern z.B. OKT3, AT9) steigt die Inzidenz aktiver HCMV-Infektionen deutlich an. Diese korreliert mit einer Ausschüttung von Zytokinen wie IL-2, IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$  und besonders TNF $\alpha$  (Asadullah et al., 1999; Döcke et al., 1994; Fietze et al., 1994; Hummel et al., 2002). TNF $\alpha$  induziert die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B und steigert nachfolgend die Aktivität des IE1/2-Enhancer/Promotor in HL-60- und U-937 Zellen, die undifferenzierten Vorläuferzellen der Monozyten/Makrophagen ähnlich sind (Prösch et al., 1995; Stein et al., 1993). Die Behandlung mit TNF $\alpha$  konnte latentes HCMV in *in vitro* infizierten Granulozyten/Makrophagen Vorläuferzellen reaktivieren (Hahn et al., 1998) sowie latentes Maus-Virus (MCMV) im *in vivo* Mausmodell (Hummel et al., 2002).

Für das Herpes Simplex Virus bereits lange bekannt, hat auch Stress und seine körperlichen Reaktionen einen direkten Einfluss auf die Reaktivierung von HCMV. Klinische Studien mit

Patienten unter besonderer Stresseinwirkung, z.B. nach Myokardinfarkt oder Probanden vor Prüfungen, zeigen eine erhöhte Inzidenz aktiver HCMV-Infektionen, erhöhte HCMV IgG Level oder vermehrte Virusausscheidung (Archimandritis et al., 1992; Glaser et al., 1985; Prösch et al., 2000 b; Prösch et al., 2000 a; Toro et al., 1996). Stress führt zur vermehrten Ausschüttung von Katecholaminen und Glukokortikoiden. Beide Stoffe induzieren in monozytären Zellen einen Signalweg, der zur gesteigerten Bindung von CREB1/ATF-1 und des Glukokortikoidrezeptors (GR) am IE1/2-Enhancer und nachfolgend zu einer erhöhten Aktivität des IE1/2-Enhancer/Promotors führt (Lee et al., 1999; Prösch et al., 1999; Prösch et al., eingereicht). Über den cAMP-Signalweg können auch Medikamente wie Pentoxifyllin die Etablierung von HCMV-Infektionen zusätzlich begünstigen (Staak et al., 1997).

Im Überblick wird deutlich, dass nicht einzelne Mechanismen für sich, sondern eher das Zusammenspiel mehrerer Prozesse (s.o.) die Virus-Reaktivierung ermöglicht.

## 1.7 Fragestellung der Arbeit

HCMV wird in der Brustmilch der überwiegenden Zahl seropositiver Mütter in den ersten Wochen nach der Geburt ausgeschieden (Asanuma et al., 1996; Hamprecht et al., 2001; Hotsubo et al., 1994; Mosca et al., 2001). Da bei den meisten Müttern keine systemische HCMV-Infektion nachweisbar ist, wird eine lokale Virusreaktivierung und -vermehrung von HCMV in der laktierenden Brust oder Milch diskutiert. Weder der Latenzort des Virus in der Brustdrüse, noch die Mechanismen, die die hypothetische Reaktivierung des Virus auslösen oder unterstützen, sind gegenwärtig bekannt. Auf der Basis des Modells der lokalen Reaktivierung von HCMV während der Laktation postulieren wir, dass in der laktierenden Brust Substanzen produziert und in die Milch ausgeschieden werden, welche die HCMV-Replikation steigern. Da gezeigt wurde, dass die Virolaktia einer charakteristischen Kinetik mit maximalen Virustitern zwischen der 3. und 6. Woche nach Geburt folgt (Hamprecht et al., 2001; Yasuda et al., 2003), soll auch das Auftreten von Substanzen, welche die Virusreplikation stimulieren oder die Reaktivierung des latenten Virus beeinflussen könnten, im zeitlichen Verlauf untersucht werden. Hierzu sollen im Rahmen einer klinischen Studie Muttermilchproben von 10 Müttern frühgeborener Kinder aus der Klinik für Neonatologie Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte einmal wöchentlich während der ersten beiden Monate nach der Geburt gesammelt und untersucht werden.

Für das Ausmaß der HCMV-Replikation und im Prozess der Reaktivierung spielt die Expression der HCMV Immediate Early Proteine IE1 und IE2 eine Schlüsselrolle (Greaves et al., 1998; Iskenderian et al., 1996). Ihre Expression wird von dem HCMV IE1/2-Enhancer/Promotor kontrolliert (Boshart et al., 1985). In dieser Arbeit soll durch *in vitro* Infektions – und Transfektionsversuche der Einfluss von zellfreier Molke aus der Brustmilch stillender Mütter auf die Virusreplikation und Aktivität des IE1/2-Enhancer/Promotors in monozytären Vorläuferzellen (einem natürlichem Latenzort von HCMV) untersucht werden.

Als Beitrag zur Epidemiologie der peri- und postnatalen HCMV-Infektionen sollen im Rahmen der klinischen Studie die Inzidenz der mütterlichen HCMV-Reaktivierung und Transmission auf ihre frühgeborenen Kinder bestimmt werden. Hierzu wird über einen Zeitraum von zwei Monaten wöchentlich Muttermilch, kindlicher Urin und Tracheal/Pharyngealsekrete gesammelt und mittels PCR auf HCMV-DNA untersucht. Zusätzlich sollen der HCMV-Serostatus der Mütter ermittelt und mütterliches Blut auf eine systemische HCMV-Infektion (DNAemia) untersucht werden. Die Auswertung der epidemiologischen Daten erfolgt unter Einbeziehung

von Daten, die im Rahmen einer Studie zur Rolle von HCMV für die Entstehung der Bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) erhoben (Prösch et al., 2002 b) und bisher nicht ausgewertet wurden.

Die Studien im Rahmen der vorliegenden Arbeit stellen einen Beitrag zur Bewertung des Risikos peri- und postnataler HCMV-Infektionen bei Frühgeborenen unter besonderer Berücksichtigung der Übertragung durch Muttermilch dar. Erstmalig sollen durch *in vitro* Versuche potentielle Mechanismen der HCMV-Reaktivierung und -Replikationssteigerung in der laktierenden Brust aufgezeigt werden.



## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Zelllinien**

#### **2.1.1 Monozytäre Zelllinien HL-60 und THP-1**

Für die *in vitro* Transfektionsexperimente wurden die Zelllinien HL-60 („American type culture collection“ (ATCC) CCL 240) und THP-1 (ATCC TIB 202) verwendet. HL-60 Zellen ähneln frühen undifferenzierten monozytären Vorläuferzellen, die in Abhängigkeit von den jeweiligen Stimuli entweder zu Granulozyten oder zu Monozyten/Makrophagen ausdifferenzieren können. THP-1 Zellen ähneln reifen Monozyten. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in RPMI 1640-Medium bei 37°C, in wassergesättigter, 5%-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre unter Zusatz von 10 % endotoxin- und mykoplasmenfreiem fetalem Kälberserum (FKS), 5 IE/ml Penicillin, 150 µl/ml Streptomycin und 10 µl/ml N-Acetyl-L-Alanyl-Glutamin (200 mM; Biochrom). Zur Haltung wurde die Zellkulturen in 2-3 tägigem Abstand im Verhältnis 1:3 in frisches Medium umgesetzt.

#### **2.1.2 Humane embryonale Lungenfibroblasten (HELFL)**

In den Versuchen zur Virusreplikation und Expression viraler Proteine wurden diploide humane embryonale Lungenfibroblasten (HELFL, FI 301) verwendet.

Für die Westernblot Analysen wurden die Zellen in Müllerflächen bei 37°C in Minimal Essential Medium (MEM) mit Earle's Salzen und 25 mM Hepes (Bio Whittaker) mit Zusätzen der Firma Biochrom (2 % endotoxinfreies FKS, 1 % N-Acetyl-L-Alanyl-Glutamin [200 mM], 1 % nicht-essentielle Aminosäuren [100x], 1 % Natriumpyruvat [100 x], 5 g/ml Gentamycinsulfat) kultiviert.

Für Plaque-Tests wurden HELFL in 24-Well-Platten kultiviert und nach Infektion mit HCMV mit 2 ml MEME/Methoziel-Medium (90 ml Methoziel, 5 ml MEM [10 x Eagle], 5 ml MEM [10 x Hanks], 2,9 ml NaHCO<sub>3</sub> [7,5%], 2 ml endotoxinfreies FKS, 1 ml N-Acetyl-L-Alanyl-Glutamin [200 mM], 0,275 ml Penicillin/Streptomycin) überschichtet.

### **2.2 Virus**

In allen Infektionsexperimenten wurde das HCMV-Isolat AD169 verwendet. Virusstocks wurden nach Zentrifugation (10', 2000 rpm) aus dem Überstand vollständig infizierter HELFL-Kulturen gewonnen und in flüssigem Stickstoff gelagert.

## 2.3 Plasmide

Das Plasmid **pRR55** hat eine Größe von 4086 bp und enthält den HCMV Haupt-IE1/2-Enhancer/Promotor des laboradaptierten Stammes AD169 (zwischen den Positionen –671 und +52 bp bezogen auf den IE1 Transkriptionsstart) gekoppelt an das Chloramphenicol-Acetyltransferase-Reportergen (CAT-Gen), sowie das Polyadenylierungssignal des „simian virus 40“ (SV 40) kloniert im Vektor pUC18 (Fickenscher et al., 1989).

In den Mutanten **p17mut3**, **p18mut4** und **p19mut5** dieses Plasmids sind im Enhancer repetitive cis-agierende Elemente mutiert. Hierdurch wird die Bindung und die damit einhergehende transaktivierende Wirkung der Transkriptionsfaktoren CREB1/ATF1 (p19mut5), NFκB (p18mut4) und des Glukokortikoid-Rezeptorkomplexes (p17mut3) verhindert. Die Mutagenese von p18mut4 und p17mut3 wurde beschrieben (Prösch et al., 2000 b; Prösch et al., eingereicht; Prösch et al., 2002). Die Mutante p19mut5 wurde durch Nukleotidaustausch von AC zu TG in den 5 „cAMP-responsive elements“ innerhalb der 19 bp repetitiven Sequenzen erzeugt (Ozar Jasmin, 2002).

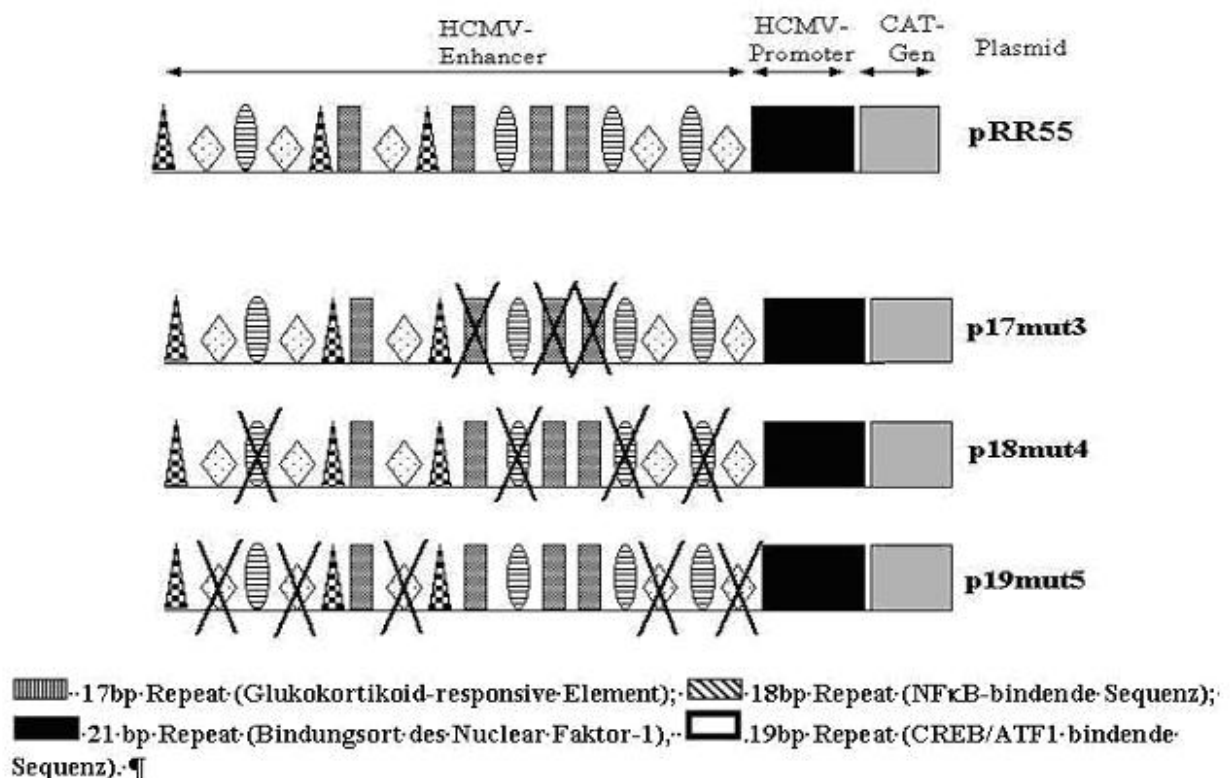


Abb. 4: Schematische Darstellung der HCMV IE1/2-Enhancer/Promotor Region und Lokalisation der Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren (dargestellt als Pfeile). Die Lokalisation der Mutationen in den repetitiven Sequenzmotiven der verwendeten pRR55-Mutanten p17mut3, p18mut4 und p19mut5 sind durch X symbolisiert.

Im Plasmid **p $\beta$ c-344/-1 CAT** ist die DNA-Sequenz des Ratten  $\beta$ -Kasein Promotors zwischen den Positionen –344 und –1 in den CAT-Expressionsvektor pBLCAT2 einkloniert (Doppler et al., 1990). Es wurde freundlicherweise von W. Doppler zur Verfügung gestellt.

Das 2686 bp große Plasmid **pUC18** enthält Teile des pBR322 Vektors und des Bakteriophagen M13mp19, jedoch keine Anteile des HCMV IE1/2-Enhancer/Promotors oder eines anderen eukaryotischen Promotors und wurde daher als neutraler Vektor zum Ausgleich von DNA-Mengen in Kotransfektionsexperimenten verwendet.

## 2.4 Hormone, Zytokine, Hemmstoffe

- |  |               |
|--|---------------|
| • Dexamethason-21-dihydrogenphosphat             | Merck         |
| • Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) | PeptoTeck     |
| • Dibuturyladosine cyclic monophosphat (db cAMP) | Sigma         |
| • Humanes Prolaktin (hPRL)                       | Sigma         |
| • Human Epidermal Growth Factor (hEGF)           | PeptoTech     |
| • Glukokortikoid-Inhibitor RU-486 (Mifepristone) | Roussel-Uclaf |

## 2.5 Patienten und Patientenmaterial

### 2.5.1 Patienten

Das untersuchte Patientenmaterial stammt von Müttern (Citratblut, Muttermilch) und ihren frühgeborenen Kindern (Urine, Trachealsekrete/Pharyngealaspirate), die zwischen Mai 1999 und Oktober 2002 (1. Studienteil) bzw. Oktober 2002 und Juni 2003 (2. Studienteil) auf der Intensivstation der Klinik für Neonatologie Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte hospitalisiert wurden. Die Frühgeborenen waren vor der 32. Schwangerschaftswoche oder mit einem Geburtsgewicht <1500 g geboren. Die Sammlung der Proben erfolgte nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Charité und nach Einverständniserklärung der Mütter. Kinder wurden nur mit nativer Milch der eigenen Mutter über eine Nasenonde gefüttert. Bei nicht ausreichender Milchmenge wurde Frühgeborenen Formula-Nahrung hinzugefügt. Es wurden ausschließlich HCMV-seronegative Blutprodukte transfundiert.

Die Reifebezeichnung der Kinder in der Arbeit erfolgt nach der von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) vorgeschlagenen Definition:

*Frühgeborenes* = Kind, welches vor der 37. Schwangerschaftswoche

*Sehr kleines Frühgeborenes* = “very low birth weight infants“, Neugeborenes mit einem Geburtsgewicht <1500 Gramm

*Extrem kleines Frühgeborenes* = “extremely low birth weight infants“, Neugeborenes mit einem Geburtsgewicht <1000 Gramm

### **2.5.2 Gewinnung von Muttermilch und zellfreier Molke**

Frische Milch von Müttern frühgeborener Kinder wurde nach Abpumpen auf der Station umgehend bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Probenaufbereitung und weiteren Verwendung gelagert. Zur Gewinnung von zellfreier und fettreduzierter Molke wurde ein modifiziertes Protokoll nach Hamprecht et al. (1998 b) verwandt: In vier Zentrifugationsschritten von je 10 min. bei 800 rpm, 1500 rpm, 3000 rpm und 5000 rpm (Heareus Megafuge 1,0 R) wurden der Fettüberstand und das Zellpellet entfernt. Zum Einsatz in Zellkultur wurde die Molke durch einen  $0,22\text{ }\mu\text{m}$  Mikroporenfilter (Schleicher & Schuell) steril filtriert.

### **2.5.3 Gewinnung von Urin, Trachealaspiraten und Pharyngealsekreten**

In wöchentlichen Abständen wurden kindliche Trachealaspirate (TS = Absaugprodukte aus dem Intubationstubus) oder Pharyngealsekrete (PS = Absaugprodukte aus dem hinteren Rachenraum nach Extubation) sowie Urinproben gesammelt und bis zur Aufarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.5.4 Serum und Periphere Blutmonozyten (PBMC)**

Mütterliches Blut wurde innerhalb der ersten 14 Tage nach Entbindung entnommen. Serum durch Zentrifugation gewonnen aus Vollblut diente der Bestimmung des HCMV-Antikörper Status mittels ELISA (CMV-IgM ELA Assay [Medac], ETI-CYTOK-G, ETI-CYTOK-G Plus [Sorin Biomedica]). Die Isolation von Peripheren Blutmonozyten (PBMC) erfolgte aus 5 ml frischem EDTA-Blut mittels Ficollgradienten-Zentrifugation auf 3 ml Ficoll-Plaque (Pharmacia, 10', 4000 rpm). Die gewonnenen Zellpellets wurden in PBS gewaschen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur DNA-Präparation eingefroren.

## 2.6 Statistik

Die statistische Auswertung der biometrischen Daten und klinischen Charakteristika der Frühgeborenen erfolgte mittels Mann-Whitney Test. Für die Analyse der durch Molkeproben hervorgerufenen Promotorstimulation im CAT-Essay wurde der nichtparametrische Wilcoxon Test für gepaarte Proben mit Hilfe der Software Statgraphics 7.0 (Manogistics) und SPSS 11.5.1 (SPSS) verwendet. Die Signifikanzgrenze wurde mit  $p < 0,05$  definiert.

## 2.7 DNA-Isolierung und Polymerase Kettenreaktion

### 2.7.1 DNA-Isolierung

DNA aus je 200  $\mu$ l Urin-, TS, PS, PBMC- und Molkeproben wurde mit Hilfe des High Pure Viral Nucleo Acid-Kits (Roche) isoliert. Die Aufbereitung der Proben erfolgte nach den Angaben des Herstellers über Bindung der DNA an Spinnsäulen, von denen die DNA in ein Endvolumen von 50  $\mu$ l Elutionspuffer eluiert wurde.

### 2.7.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

#### 2.7.2.1 HCMV-PCR

Die verwendeten Primer P1 und P2 amplifizieren ein 123 bp Fragment komplementär zur Immediate Early Region I des HCMV. Die Sequenz der Primer ist wie folgt (Olive et al., 1989):

P1: 5'-gCA gAg CTC gTT TA g TgA ACC -3'

P2: 5'- CCg TTC CCg gCC gCg gAg gC -3'

Die Durchführung der PCR erfolgte in einem Gesamtvolumen von 25  $\mu$ l. Pro Amplifikation wurden 5  $\mu$ l der DNA-Suspension (siehe Kap. 2.7.1) und 20  $\mu$ l Prämix eingesetzt. Der Prämix setzte sich wie folgt zusammen:

- 2,5  $\mu$ l dNTP (je 0,2 mM; Amersham Pharmacia)
- 0,5  $\mu$ l Primer P1 (50  $\mu$ M, TIB Molbiol)
- 0,5  $\mu$ l Primer P2 (50  $\mu$ M, TIB Molbiol)
- 0,1  $\mu$ l Ampli-Taq Gold (5 U/ $\mu$ l; Roche)
- 1,5  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (100 mM Roche)
- 2,5  $\mu$ l PCR-Puffer II (10x; Roche)
- 12,5  $\mu$ l Aqua dest

Das Reaktionsgemisch wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Die Amplifikation erfolgte im Thermo-Cycler (Hybaid Omn-E) über 40 Zyklen. Auf einen initialen 5 minütigen Denaturierungsschritt bei 94°C folgten 40 Zyklen mit 30'' 94°C-Denaturierung, 1' 55°C-Primeranlagerung und 2' 72°C DNA-Synthese.

Nach elektrophoretischer Auftrennung von 10 µl des PCR-Produktgemisches in einem 2%-igem Agarosegel mit Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) konnten die amplifizierten Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Sensitivität der PCR beträgt 10-50 HCMV-DNA-Kopien pro Ansatz (Prösch et al., 2002). Um falsch positive Ergebnisse durch Kontaminationen zu vermeiden, wurden verschiedene Proben eines Patienten getrennt an mindestens vier (meist sechs) verschiedenen Tagen präpariert. Bei jeder DNA-Isolation wurde eine Negativkontrolle mit PBS anstatt Patientenmaterial mitgeführt und zusätzlich zur Standard PCR-Negativkontrolle (Wasserkontrolle) in der PCR-Reaktion getestet. Als Positiv-Kontrolle fungierte 0,1 pg DNA aus mit AD169 infizierten Fibroblasten. Mit diesem Protokoll wird eine Sensitivität von  $\geq 50$  DNA-Kopien pro Reaktion erreicht.

#### 2.7.2.2 $\beta$ -globin PCR

Zum Ausschluss falsch negativer Ergebnisse wurde jede Patientenprobe, die in der HCMV-PCR negativ war, auf das Vorhandensein von  $\beta$ -globin DNA überprüft. Die  $\beta$ -globin PCR wurde nach einem erstmalig von Bauer et al. (Bauer et al., 1991) beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Die verwendeten Primer BG1 und BG3 hatten folgende Sequenzen:

- BG1: 5'-gAA gAg CCA Agg ACA ggT AC- 3'
- BG3: 5'-CAA CTT CAT CCA CgT TCA CC-3'

Als Positivkontrolle diente 1 µg DNA aus Plazentagewebe. Die Analyse der Amplifikate erfolgte elektrophoretisch auf Basis der Länge des amplifizierten Fragments (268 bp). Als Vergleich wurde ein 100 bp DNA-Längenstandard (BioLabs, USA) aufgetragen.

## **2.8 Transfektion monozytärer Zellen**

### **2.8.1 DEAE-Dextranmethode**

Die HL-60 und THP-1 Zellen wurden nach der von Stein et al. (Stein et al., 1993) optimierten Methode transient transfiziert. Hierzu wurden pro Ansatz  $10^6$  Zellen in serumfreiem RPMI 1640 Medium gewaschen und mit 5 µg Plasmid-DNA in 500 µl TBS/DEAE-Dextran-Puffer (137 mM NaCl; 0,7 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 5 mM KCl; 25 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,6 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 10 mg/ml Dextran) für 45-60 min bei 37°C unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Nach erneutem Waschen in serumfreien RPMI-Medium wurden das Zellpellet in Medium/10 % FKS resuspendiert und je  $10^6$  Zellen in 24-Well Platten inkubiert. Mit dieser Methode wurde eine Transfektionseffizienz von ~10 % erreicht. Zur Testung der Molke wurden 400 µl Medium/10 % FKS und, wenn nicht anders angegeben, 200 µl Molke hinzugefügt. Alle Zellen wurden bis zur Ernte bei 37°C in einer wassergesättigten, 5%-igen  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre kultiviert.

### **2.8.2 Elektroporation**

Zur Analyse von Reporter-gen-Aktivitäten des Plasmids p $\beta$ c-344/-1CAT reichte die durch die DEAE/Dextran Methode erzielte Transfektionseffizienz nicht aus. Dieses Plasmid wurde daher mittels Elektroporation transfiziert, wobei  $10^7$  HL-60 Zellen zunächst in serumfreien RPMI 1640 gewaschen, in 0,5 ml Medium (RPMI 1640) wiederaufgenommen und mit 30 µg Plasmid DNA elektroporiert wurden. Bei Kotransfektion mit zwei Plasmiden wurde die Gesamtmenge DNA durch Zugabe des Plasmids pUC 18 angeglichen. Die Elektroporation erfolgte in 4 mm Küvetten (Equi Bio) im Elektroporator Easy Jet Plus (Equi Bio) bei 270 V und 1050 µF. Die Impulsdauer wurde automatisch errechnet und betrug zwischen 20-25 msec. Durch diese Methode wurden ~50 % der Zellen transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen umgehend in 4,5 ml RPMI/10 % FKS aufgenommen und bis zur Ernte unter An- oder Abwesenheit der zu testenden Substanzen bei 37°C in einer wassergesättigten, 5 %-igen  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre inkubiert.

## **2.9 Gewinnung von Zelllysaten und CAT-Assay**

Mit Hilfe des CAT- Assays kann die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) Aktivität in Zellextrakten transfizierter Zellen gemessen werden. Die auf den eingeschleusten Plasmiden kodierte Chloramphenicol-Acetyl-Transferase wird in dem Maße gebildet wie der stromaufwärts vom Reportergen klonierte HCMV IE1/2-Enhancer/Promotor aktiviert wird. Die CAT-Aktivität ist daher ein Maß für die Promotoraktivität.

### **2.9.1 Ernte der Zellen und Gewinnung der Zelllysate**

Die Ernte der Zellen erfolgte 30-40 Stunden nach Transfektion. In Vorversuchen wurde überprüft, dass sich die Zellzahl durch die Zugabe von Molke im Vergleich zur Kontrolle nicht veränderte.

Zur Ernte wurden die Zellen zentrifugiert (10', 2000 rpm), mit PBS gewaschen und das Zellpellet in 40-60 µl CAT-I Puffer (0,25 mM Tris pH 7,5; 5 mM EDTA) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch fünfmaliges, fünfminütiges Frieren (Trockeneis/Ethanol Gemisch) und Tauen (37°C). Störende CAT-Isoenzyme wurden durch 10-minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert. Durch Zentrifugation (10', 12 rpm) wurden die Zellbestandteile abgetrennt und das Zelllysate für den CAT-Assay gewonnen.

### **2.9.2 Proteinbestimmung der Zelllysate**

Der Proteingehalt der Zellextrakte wurde nach der Methode von Bradford (Bradford et al., 1976) bestimmt. Hierfür wurden je 5 µl des Zellextraktes und 95 µl PBS bzw. 100 µl PBS für den Leerwert in Eppendorfgefäße vorgelegt. Für die Kalibrierkurve wurden 100 µl einer Rinderserumalbumin-Standardlösung (RSA, Serva) mit den Konzentrationen 30, 70, 100, 150, 200 und 250 µg/ml vorbereitet. Die Zugabe von 1 ml Bradford-Lösung (Sigma) erfolgte möglichst in alle Proben. Nach kurzem Mischen und einer Inkubationszeit von mindestens 20 min wurden die Reaktionslösungen in Küvetten überführt und die Adsorption bei 595 nm im Photometer (Ultrospec Plus; Pharmacia) gemessen. Der Nullwert-Abgleich erfolgte gegen den Leerwert (PBS statt RSA). Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben wurden mittels der Kalibrierkurve bestimmt und für den CAT-Assay auf einen gleichen Proteingehalt eingestellt.



### 2.9.3 CAT-Assay

Zur Messung der CAT-Aktivität wurden 20-30 µl Zellextrakt (gleiche Menge je Versuchreihe siehe Kap. 2.9.1.) mit 15 µl eines Prämix:

- 8µl C14- Chloramphenicol (0,025mCi/ml, Hartmann Analytic)
- 4 µl Tris-HCl (0,3 M; pH 7,5)
- 5 µl Aceytl-CoA (3,3 µg/ml Sigma)

gemischt.

Durch getrenntes Pipettieren der Zellextrakte und des Prämix an die Wand der Reaktionsgefäße und kurze Zentrifugation (5'', 4000 rpm) wurde ein gleichzeitiger Start der chemischen Reaktion in allen Ansätzen gewährleistet. Die Proben wurden für 60 min bei 37°C inkubiert und die Reaktionen durch Zugabe von 500 µl Ethylacetat abgestoppt. Nach kräftigem Schütteln (Vortex) und Zentrifugation (3', 12000 rpm) wurden die radioaktiven Reaktionsprodukte aus der wässrigen Phase extrahiert und mittels Vakuumzentrifugation (Univapo 150 N, Uniequip) vollständig eingengt. Zum Auftragen auf die Dünnschichtchromatographieplatte (20 x 20 cm Kieselgelplatten, Merck) wurden die Reaktionsprodukte in 30 µl Ethylacetat gelöst. Die Auftrennung der nicht-, einfach- und mehrfach-aceythlierten Chloramphenicol-Derivate erfolgte in einer Chloroform:Methanol-Atmosphäre (19:1) unter dem Abzug, wobei Chloramphenicol-Derivate desto schneller laufen, je mehr sie acetyliert sind. Mittels des Automatic TLC-linear Analyzer (Tracemaster 20, Bertholdt) wurde die Verteilung der Radioaktivität in den einzelnen Spots gemessen und der prozentuale Anteil von acetyliertem C14-Chloramphenicol errechnet.

### 2.10 Plaque Test und immunzytochemische Färbung HCMV-infizierter Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses von Substanzen auf die HCMV-Replikation wurden Humane Embryonale Lungenfibroblasten (HELFI) infiziert und mit einem halbfesten Methozel-Medium überschichtet. Dieses verhindert die freie Virusausbreitung weitestgehend. Das sich durch Zell-zu-Zell Kontakt ausbreitende Virus verändert die Morphologie der infizierten Zellen; typische Foci abgerundeter, vergrößerter Zellen werden als cytopathische Effekte (CPE) lichtmikroskopisch sichtbar. Die Ansammlungen infizierter Zellen werden nach immunzytochemischer Anfärbung mittels eines HCMV-spezifischen Antikörpers besonders deutlich sichtbar. Anzahl der CPE und die Zahl infizierter Zellen pro CPE ermöglichen Rückschlüsse auf das Ausmaß der viralen Infektion und Replikation.

### **2.10.1 Standard– Plaque Test**

Konfluente HELF-Kulturen wurden in 24-Well Platten mit einer m.o.i (multiplicity of infection - Virus pro Zelle) von 0,02 des HCMV-AD169 infiziert. Hierzu wurden die Zellen mit 200 µl einer entsprechende Virusverdünnung in serumfreien MEME Medium zur Absorption eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen des nichtadsorbierten Virus wurden die Zellen mit 2 ml MEME/Methozel (Zusammensetzung Kap. 2.1.2.) überschichtet. Zur Testung der Molke wurden 200 µl des MEME/Methozels durch 200 µl Molke ersetzt. Die infizierten Zellen wurden bei 37°C in 5 %-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert bis charakteristische CPEs lichtmikroskopisch erkennbar wurden.

### **2.10.2 Immunzytochemische Färbung HCMV-infizierter Zellen**

Zu besseren Sichtbarmachung HCMV-infizierter Zellen wurden die Zellen mit dem HCMV-spezifischen Antikörper „anti-HCMV early antigen clone E13“ angefärbt, der die kernlokalisierten IE Proteine IE1 und IE2 detektiert. Hierzu wurden die Kulturen 6-10 Tage nach Infektion für 30 Minuten bei –20°C mit eiskaltem Ethanol/Aceton-Gemisch (95:5) fixiert. Zur Vermeidung unspezifischer Bindung wurden die Zellen mit einer Blockierungslösung aus 10 % FKS/0,2 % Tween (Serva) in PBS benetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen der Blocking-Reagenz wurden die Zellen mit 100 µl einer 1:1000 Verdünnung des HCMV-spezifischen monoklonalen Antikörpers E13 (Mouse Anti CMV Early Antigen, Oxford Biotech) in Blockierungslösung überschichtet und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurde der Sekundärantikörper (Goat Anti-Mouse IgG Peroxidase; Boehringer Mannheim) in einer 1:5000 Verdünnung auf die Zellen gegeben. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 2 Stunden bei 37°C. Nach erneutem fünfmaligem Waschen mit PBS konnten die Antigen-Antikörperkomplexe durch Anfärbung mit Chromogen (AEC-Chromogen Staining Kit, Sigma) sichtbar gemacht und lichtmikroskopisch ausgewertet werden.

## **2.11 Western Blot Analysen**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Western Blot Analysen zur Quantifizierung der Menge von gebildetem HCMV IE1 und IE2 Protein in infizierten Fibroblasten unter dem Einfluss von Molke durchgeführt. Hierzu werden HELF Kulturen mit dem HCMV-Isolat AD169 infiziert und in An- und Abwesenheit von Molke kultiviert. Gleiche Proteinmengen der aus den

Zellen hergestellten Extrakte wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Durch Anfärbung mit einem Antikörper, der die IE1 und IE2 Proteine spezifisch erkennt, wurden die Proteinbanden sichtbar und konnten semiquantitativ ausgewertet werden.

### 2.11.1 Infektion der HELF-Kulturen

Ein konfluenten HELF-Monolayer in Müllerflaschen (106 HELF) wurden mit AD169 (m.o.i.=1) infiziert. Zur Adsorption wurden die Zellen mit dem Virus bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 4 ml MEME/2% FKS. Um den Einfluss von Molke auf die IE1 und IE2 Proteinsynthese zu bestimmen wurden 1,2 ml Medium durch eine entsprechende Menge Molke ersetzt. Die infizierten Zellen wurden bei 37°C kultiviert und nach 3 Tagen geerntet. Hierzu wurde der Zellrasen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mittels eines Zellschabers (Greiner) abgeschabt. Die gewonnenen Zellen wurden in PBS resuspendiert und weitere zweimal mit PBS gewaschen und zentrifugiert (5', 2000 rpm). Nach Kurzzentrifugation (20'', 7000 rpm) wurde das Zellpellet zum Aufschluss der Zellen in 120µl Lysepuffer mit Proteinase-Inhibitoren resuspendiert.

#### Lysepuffer-Stock:

- |                                  |                         |
|----------------------------------|-------------------------|
| • 5 ml 1 M Tris pH 7,5           | Endkonzentration: 20 mM |
| • 7,5 ml 5 M NaCl                | 150 mM                  |
| • 2,5ml NP40                     | 1,0 %                   |
| • 0,5 ml NaN <sub>3</sub> (10 %) | 0,02 %                  |
| • acqua dest ad 250 ml           | 2,5 mM                  |

#### Proteinase-Inhibitor Mix: (auf 1 ml Lysepuffer)

- |  |         |
|--|---------|
| • 5 µl EDTA (0,1 M)  | 2,5 mM  |
| • 5 µl Phenylmethyl-sulfonyl-fluorid PMSF (0,4 M in Ethanol) | 2 mM    |
| • 2 µl Leupeptin (0,5 mg/ml in Ethanol)                      | 2 µg/ml |
| • 1 µl Aprotinin (1 mg/ml in Ethanol)                        | 1 µg/ml |
| • 1 µl Antipain (1 mg/ml in Ethanol)                         | 1 µg/ml |

Die Zelllyse wurde durch leichtes Schütteln bei 4°C für eine Stunde unterstützt. Anschließende Zentrifugation (50', 16500 rpm, 4°C) ermöglichte die Abtrennung partikulärer Bestandteile aus dem Zellextrakt. Der Proteingehalt der Proben wurde mittels Bradford-Methode bestimmt (siehe Kap. 2.9.2).

### 2.11.2 Western Blot Analysen

Zur Quantifizierung der IE-Proteine in den gewonnenen Zellextrakten wurden je 40 µg Gesamtprotein mit 1/3 Volumen Probenpuffer (25 ml Tris pH 6,8; 10 ml Glycerin; 5 ml 2-Mercaptoethanol; 1 ml Bromphenolblau (1%), 2 g SDS, aqua dest ad 100 ml) für 5 Minuten bei 100°C denaturiert und in einem 10%-igen Polyacrylamid- SDS Gel in 1x Laemmli-Puffer (10-fach Stammlösung: 144 g Glycin, 30 g Tris Base, 10 g SDS, aqua dest ad 1000 ml) elektrophoretisch aufgetrennt.

Das Gel bestand aus einem Sammelgel (1,5 % PAA/SDS) und einem Trenngel (10 % PAA/SDS), die folgende Zusammensetzung hatten:

#### Sammelgel (1,5%)

- 625 µl Tris-HCL, pH 6,8
- 500 µl Acrylamid/Bis 29:1 (30 %)
- 25 µl SDS (20 %)
- 50 µl Ammoniumpersulfat (10 %)
- 10 µl TEMED
- 3,79 ml dd H<sub>2</sub>O

#### Trenngel: (10%)

- 3,75 ml Tris-HCL, pH 6,8
- 3,33 ml Acrylamid/Bis 29:1 (30 %)
- 50 µl SDS (20 %)
- 100 µl Ammoniumpersulfat (10 %)
- 20 µl TEMED
- 2,75 ml dd H<sub>2</sub>O

Die Trennung erfolgte entsprechend dem Molekulargewicht der Proteine. Als molekularer Längenstandard wurden 2 µl des BOA002-Protein Marker (MoBiTec) aufgetragen.

Der Transfer der Proteine auf eine 9 x 6 cm Nitrocellulose Membran (Schleicher & Schuell) erfolgte im Tank-Blot Verfahren mit Hilfe des Mini Tank Elektrobloetter (OwlScientific) bei 250 mV für 2 Stunden in einem Puffergemisch aus 10-fach Laemmli-Puffer, Methanol und Aqua dest (1:2:7).

Die Membran wurde über Nacht in 50 ml 1xTBS (10-fach Stammlösung: 100 ml Tris pH 7.4 [10 mM], 90g NaCl [0,9 %], 5 ml Tween 20 [0,05 %], aqua dd at 1000 ml) mit 1,5 g Albumin bovine Fraction V (BSA, 3%, Serva) geblockt und bei 4°C leicht geschüttelt. Nach Spülen mit 1xTBS erfolgte die Inkubation mit dem HCMV spezifischen monoklonalen Primärantikörpers "anti-HCMV early antigen clone E13" (Oxford Biotech) in einer 1:400 Verdünnung in 1xTBS

für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach fünfmaligem Waschen wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper „Goat Anti-Mouse IgG Peroxidase“ (Boehringer Mannheim) in einer 1:4000 Verdünnung in 1xTBS für eine weitere Stunde bei leichtem Schwenken und Raumtemperatur inkubiert. Auf fünfmaliges Waschen mit 1xTBS folgte die Anfärbung der Antigen-Antikörperkomplexe mit der Super Signal West Dura- Luminol/Enhancer Solution (Pierce). Die gefärbten Protein- Banden konnten unter einer CCD-Kamera mit Hilfe der Software Chemimager V.5.5 (Alpha Innotech Corp., Alpha Ease) detektiert und durch Farbdichtemessung der spezifischen Banden semiquantitativ ausgewertet werden.

Zur Darstellung der Aktin-Banden als Ladekontrolle wurde die zuvor mit dem IE 1/2-spezifischem Antikörper (siehe oben) inkubierten Membranen für 20 Minuten bei 65°C mit Strippinglösung (5 ml Tris pH 6,8, 5 ml 20%-iges SDS, 350 µl p-Mercaptoethanol, 45 ml dd H<sub>2</sub>O) inkubiert, um die gebundenen Antigen-Antikörperkomplexe zu entfernen. Einem initialen Waschschrift mit 1xTBS folgte die Inkubation mit dem Aktin-spezifischen Antikörper „Anti-Actin (C-11) goat polyclonal IgG (SantaCruz) in einer 1:1000 Verdünnung in 1xTBS sowie dem Sekundärantikörper „Anti-Goat IgG-HRP conj“ (Santa Cruz) in einer 1:4000 Verdünnung in 1xTBS nach dem oben beschriebenen Protokoll.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchungen zur Inzidenz von HCMV-Reaktivierungen während der Laktation in der laktierenden Brust und zur Virustransmission auf das gestillte Frühgeborene

Obwohl Muttermilch eine Vielzahl antimikrobieller Substanzen enthält, die das gestillte Kind vor Infektionen schützen sollte, gilt infizierte Milch als der wichtigste Übertragungsweg für HCMV in der Säuglingsphase (Dworsky et al., 1983). In verschiedenen internationalen Studien wurden zum Teil sehr unterschiedliche Inzidenzen für die HCMV-Reaktivierung während der Laktation und die Übertragung von HCMV auf Frühgeborene ermittelt. Eine in Tübingen durchgeführte Studie zeigte überraschend hohe Übertragungsraten (Hamprecht et al., 2001). Als Beitrag zur Aufklärung der Epidemiologie der HCMV-Übertragung auf Frühgeborene in der Peri/postnatalphase wurde eine prospektive klinische Studie durchgeführt. In der Neonatologie der Charité Berlin-Mitte wurde von 73 Müttern (58 im I. Studienteil; 15 im II. Studienteil) über den Zeitraum von einem (I. Teil) bis zwei Monaten (II. Teil) nach Geburt einmal wöchentlich Milchproben gesammelt und mittels PCR auf das Vorhandensein von HCMV-DNA getestet. Gleichzeitig wurden Urinproben und Trachealsekrete (Absaugprodukte aus dem Intubationstubus) bzw. Pharyngealsekrete (Absaugprodukte aus dem hinteren Rachenraum nach Extubation) ihrer 89 frühgeborenen Kinder (74 im I. Teil; 18 im II. Teil) auf HCMV-DNA untersucht. Das Untersuchungskollektiv beinhaltet 14 Zwillinge- und eine Drillingsgeburt.

Mutter-Kind Paare wurden nach schriftlicher Einverständniserklärung in die Studie aufgenommen, wenn das kindliche Gestationsalter  $\leq 32$  Wochen betrug. Nicht berücksichtigt wurden Mutter-Kind Paare, bei denen das Frühgeborene eine pränatale HCMV-Infektion, schwere Missbildungen sowie unklare metabolische Funktionsstörungen aufwies. Ausgeschlossen wurden auch Frühgeborene, die innerhalb des Untersuchungszeitraumes verstarben oder deren Mütter vor Erreichen der 3. Woche post partum keine Milch mehr gaben. Alle Kinder wurden ausschließlich mit unbehandelter Milch der eigenen Mutter über eine Magensonde gefüttert. Reichte diese Muttermilchmenge nicht aus, wurde den Frühgeborenen Formulanahrung gegeben. Für notwendige Transfusionen wurden nur HCMV-seronegative Blutprodukte der Charité-Blutbank verwendet.

Während des Untersuchungszeitraumes wurden bei zwei Müttern (eine davon brachte Zwillinge zur Welt) eine pränatale Übertragung von HCMV bei ihren 3 Frühgeborenen nachgewiesen. Die Diagnose der pränatalen Infektion erfolgte durch Nachweis von HCMV-DNA in Nabelschnurblut, mütterlichen PBMCs, sowie kindlichem Urin, Trachealsekret und Blut direkt nach der Geburt. Bei der Mutter und ihren Zwillingen war zum selben Zeitpunkt eine HCMV-

Antigenämie nachweisbar -wodurch eine Abgrenzung zur perinatalen Infektion möglich war. Diese Mutter-Kind Paare wurden aus der Studie ausgeschlossen.

### 3.1.1 Inzidenz von DNAktia und DNAemia in stillenden Müttern in den ersten beiden Monaten nach Entbindung

Zum Nachweis von HCMV-DNA in den Muttermilchproben (DNAktia), wurden aus diesen wie in Kap. 2.7. detailliert beschrieben, zunächst zellfreie Molke präpariert. Aus je 200 µl Molke wurde die Nukleinsäure isoliert und mittels PCR auf die Anwesenheit von HCMV-spezifischer DNA überprüft. Alle Proben, die in der HCMV-PCR negativ waren, wurden zusätzlich mit  $\beta$ -Globin spezifischen Primern amplifiziert. Hierdurch konnte nachgewiesen werden, dass die DNA-Präparation aus allen Proben erfolgreich war und sich in den Proben keine Substanzen befanden, welche die PCR hemmten. Abbildung 5 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der HCMV- und  $\beta$ -Globin PCR für 5 Molkeproben von 5 verschiedenen Müttern.

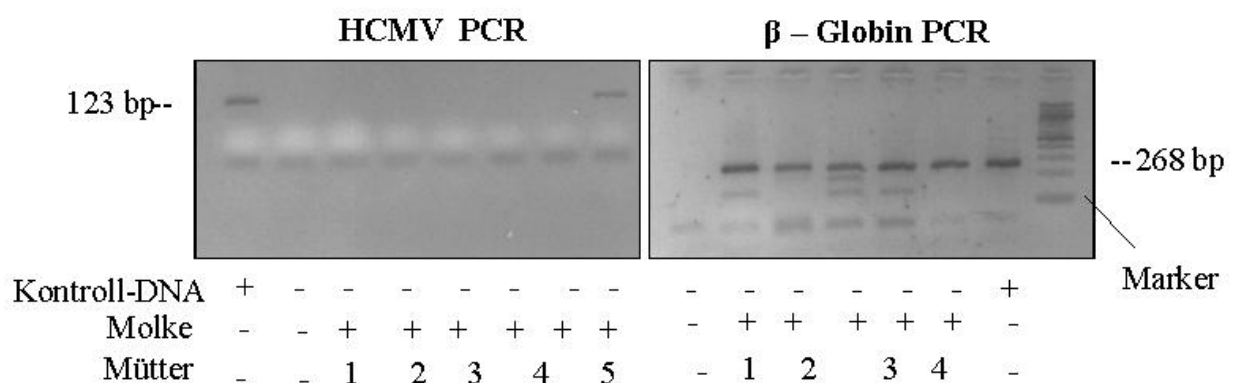


Abb. 5: HCMV- und  $\beta$ -Globin PCR aus Molkeproben von 6 Müttern.

Links: Die HCMV-PCR amplifizierte ein 123 bp DNA Fragment bei Anwesenheit von HCMV-DNA in der Molke (hier nur Mutter 5 links). Als Positivkontrolle wurde DNA aus AD169-infizierten Fibroblasten verwendet.

Rechts: Nachweis von  $\beta$ -Globin DNA in HCMV-negativen Molkeproben der Mütter 1-4. Das Amplifikat ist 268 bp lang. Als Positivkontrolle diente DNA aus Plazentagewebe. M= 100 bp Längenmarker; Roche.

Im Ergebnis aller Untersuchungen ergab sich, dass bei 48 der 73 (66 %) Mütter in mindestens 3 aufeinanderfolgenden Molkeproben HCMV-DNA nachgewiesen werden konnte (Tab.1). Die Inzidenz der HCMV-DNALaktia war in beiden Studienteilen identisch (I. Teil:  $38/58 = 66\%$ ; II. Teil:  $10/15 = 67\%$ ; Tab.1). Beide Studienteile werden im folgenden daher zusammen besprochen.

**Tab. 1: Inzidenzen von HCMV-DNALaktia bei Müttern frühgeborener Kinder (gesamt und getrennt nach den beiden Studienteilen.)**

| <b>Studien-Teil</b> | <b>Anzahl der Mütter</b> | <b>HCMV-DNALaktia positive Mütter</b> |
|---------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| I                   | 58                       | 38 / 58 (66 %)                        |
| II                  | 15                       | 10 / 15 (67 %)                        |
| I+II                | 73                       | 48 / 73 (66 %)                        |

HCMV-DNA war im Durchschnitt das erste Mal  $7,1 (\pm 2,6)$  Tage nach der Entbindung in der Molke nachweisbar. Bei allen Müttern, bei denen HCMV-DNA in einer Molkeprobe gefunden wurde, konnte auch in sämtlichen nachfolgend gesammelten Molkeproben über den gesamten Untersuchungszeitraum DNAlaktia detektiert werden.

Für 28 der 73 Mütter konnte der Serostatus ermittelt werden. Es zeigte sich, dass 20 dieser 28 Mütter HCMV-IgG positiv, 8 seronegativ waren (Tab. 2). Dies entspricht einer Seroprävalenz von 71 %. In einer Mutter konnten zusätzlich IgM-Antikörper gegen HCMV nachgewiesen werden, was auf eine aktive HCMV-Infektion dieser Mutter hinweist. Die hierbei gemessene IgG-Avidität spricht gegen eine erst kurze Zeit zurückliegende Primärinfektion und lässt eine HCMV-Reaktivierung vermuten. In 19 von 20 (95 %) der HCMV-seropositiven Müttern war eine DNAlaktia nachweisbar. HCMV scheint daher in nahezu allen HCMV-seropositiven Müttern in einer sehr frühen Phase der Laktation reaktiviert und in der Brustmilch ausgeschieden zu werden. Interessanterweise konnte auch bei einer der 8 seronegativen Mütter (12,5 %) HCMV-DNA in der Brustmilch nachgewiesen werden.



**Tab. 2 Korrelation von mütterlichen HCMV-Serostatus und HCMV-DNALaktia.**

| <b>Serostatus</b>       | <b>HCMV-DNALaktia</b> |
|-------------------------|-----------------------|
| IgG - / IgM –<br>(n= 8) | 1 / 8 (12,5%)         |
| IgG +/ IgM –<br>(n= 19) | 18 / 19 (95 % )       |
| IgG +/ IgM +<br>(n=1)   | 1 / 1 (100 %)         |

Um zu prüfen, ob in Müttern mit HCMV-DNALaktia eine systemische HCMV-Infektion vorliegt, wurden von 19 Müttern mit bekanntem Serostatus zusätzlich zur Brustmilch periphere mononukleare Blutzellen (PBMCs) auf die Anwesenheit von HCMV-DNA geprüft. Die Blutproben wurden in den ersten beiden Wochen nach Entbindung gesammelt. Wie in Tab. 3 aufgeführt, konnte nur in 2 von 13 (15 %) Müttern mit nachgewiesener DNAlaktia auch HCMV-DNA im Blut (DNAemia) nachgewiesen werden. Eine der beiden Mütter war HCMV IgM seropositiv. Bei den anderen untersuchten Müttern war es zu keiner IgM-Serokonversion bei Nachweis von Virus in der Milch gekommen. Auch wurde keine virale DNA im Blut von Müttern gefunden, deren Molke DNAlaktia negativ getestet wurde. Diese Befunde unterstreichen die Annahme, dass es sich bei der HCMV-Reaktivierung in der Brust seropositiver Mütter während der Laktation um einen lokal begrenzten Prozess handelt.

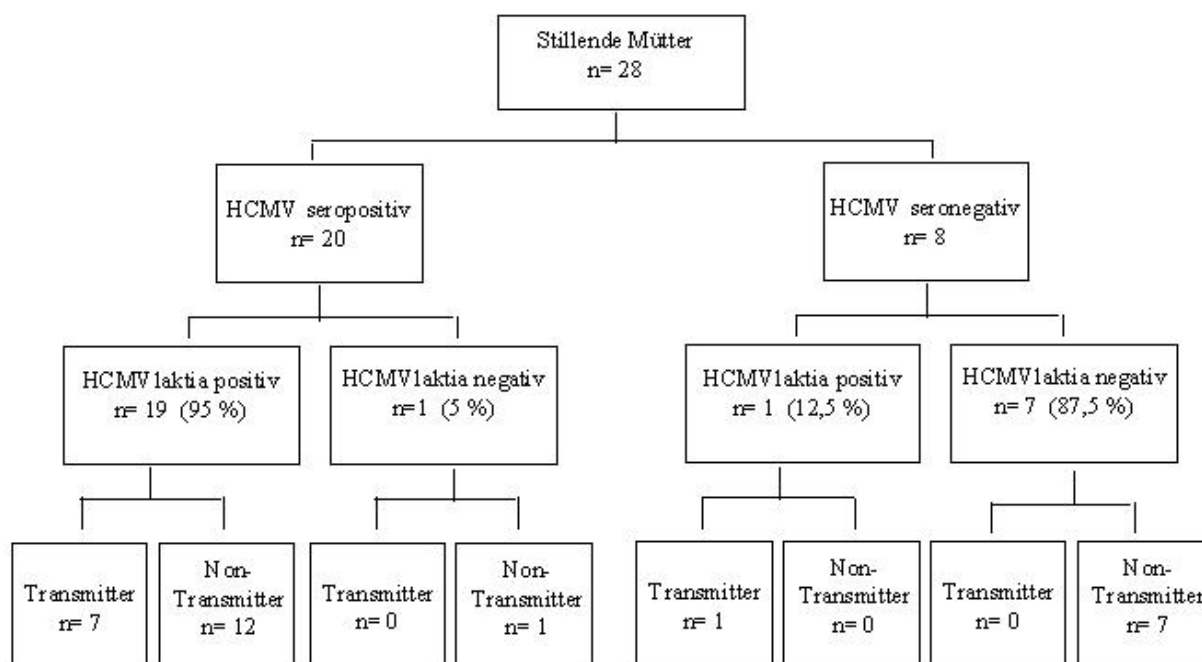
**Tab. 3: Korrelation zwischen mütterlichem HCMV-Serostatus, -DNAlaktia und -DNAemia. Dargestellt sind Daten von 19 Müttern, deren Blut und Brustmilch mittels PCR auf HCMV-DNA getestet wurde**

| <b>HCMV-Serostatus</b>  | <b>HCMV DNAlaktia</b> | <b>HCMV DNAemia in PBMC</b> |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| IgM - / IgG -<br>(n= 6) | 0 / 6 (0 %)           | 0 / 6 (0 %)                 |
| IgM - / IgG +<br>(n=12) | 12 / 12 (100 %)       | 1/12 (8 %)                  |
| IgM + / IgG +<br>(n=1)  | 1 / 1 (100 %)         | 1 / 1 (100 %)               |

### 3.1.2 Untersuchungen zur Inzidenz der HCMV Übertragung auf das Frühgeborene

Um die Mutter-zu-Kind Übertragung von HCMV zu untersuchen, wurden kindlicher Urin und Tracheal- oder Pharyngealsekrete (TS/PS) auf das Vorhandensein von HCMV-DNA bzw.  $\beta$ -Globin-DNA getestet. Der Nachweis von HCMV-DNA in drei unabhängigen, aufeinanderfolgenden Urin- und/oder TS/PS Proben wurde als Anzeichen einer HCMV-Übertragung und aktiven HCMV-Infektion im Neugeborenen gewertet. Eine perinatale Infektion liegt definitionsgemäß vor, wenn die Infektion in dem Zeitraum vom Beginn der Wehen bis eine Woche post partum stattgefunden hat. Spätere Infektionen sind postnatale Infektionen (Ho et al., 1991). Da HCMV erst frühestens eine Woche nach Infektion in internen Körperflüssigkeiten (z.B. Urin, Blut) nachweisbar ist, werden als postnatal infizierte Neugeborene nur die Kinder gewertet, bei denen virale DNA erstmals in der 2. Woche post partum im Urin nachweisbar ist (vgl. Kap. 1.5.3).

Unabhängig vom mütterlichen Serostatus übertrugen 20 von 73 Müttern (27 %) HCMV peri- oder postnatal auf ihre Frühgeborene. Bezogen auf die Mütter mit nachgewiesener DNA-laktia betrug die Transmissionsrate 42 % (20/48). Die Übertragungsraten von DNA-laktia positiven Müttern waren mit 40 % (15/38) im I. Studienteil und 50 % (5/10) im II. Studienteil vergleichbar. Der unterschiedliche Untersuchungszeitraum von einem Monat (I. Studienteil) bzw. zwei Monaten (II. Studienteil) hatte also kaum Einfluss auf das Ergebnis. Dies unterstreicht, dass die Virustransmission vorwiegend innerhalb des ersten Monats nach der Geburt erfolgte. Betrachtet man die 28 Mütter isoliert, für die der Serostatus ermittelt werden konnte, wird deutlich, dass es in der Gruppe der Mütter mit positivem HCMV-Serostatus mit 37 % (7/19) am häufigsten zu einer Übertragung des Virus auf das Neugeborene kam (Abb. 6). Die einzige Mutter mit aktiver HCMV-Infektion (IgG+/IgM+) übertrug das Virus interessanterweise nicht. In der Gruppe der seronegativen Mütter kam es nur in einem Fall zur HCMV-Übertragung. Diese Mutter hatte eine nachgewiesene HCMV-DNA-laktia bei seronegativen HCMV-Serostatus und übertrug das Virus auf ihr Kind.



**Abb. 6: Korrelation von mütterlichen HCMV-Serostatus, HCMV-DNALaktia und HCMV- Übertragung auf das Frühgeborene.**

### 3.1.3 HCMV-Infektionen der Frühgeborenen

Von den 89 untersuchten Frühgeborenen wurden 22 (24 %) im Laufe der Studie mit HCMV infiziert. HCMV-DNA konnte in allen infizierten Kindern –mit einer Ausnahme– sowohl in Proben des oberen Respirations- (Tracheal/Pharyngealsekrete) als auch des Urogenitaltraktes (Urin) nachgewiesen werden. Dies weist auf eine systemische Infektion der Kinder hin. Für 13 der 22 infizierten Frühgeborenen konnte eine postnatale Infektion durch Virusnachweis im Urin ab der 2. Woche post partum gesichert werden. Für die restlichen 9 Kinder blieb der genaue Zeitpunkt der Übertragung ungeklärt. Bei diesen Kindern waren Urin und TS/PS-Proben nach der Geburt zunächst negativ, der Urin wurden aber erstmalig bereits innerhalb der ersten oder zweiten Lebenswoche HCMV-DNA positiv. Definitionsgemäß handelt es sich hier um perinatale HCMV-Infektionen für die neben Muttermilch andere Virusübertragungswege zu diskutieren sind. 12 der 13 postnatal infizierten Kinder wurden mit HCMV-haltiger Muttermilch gefüttert. Ein Kind erhielt von der Mutter nachweislich HCMV-DNALaktia negative Brustmilch. Das zweite Kind (Zwillinge) dieser Mutter blieb uninfiziert, sodass hier nosokomiale Infektionen z.B. durch HCMV-positives aber seronegativ gescreentes Blut nicht ausgeschlossen werden können. Wie zu erwarten, waren Kinder von Müttern mit positivem HCMV-Serostatus und/oder HCMV-DNALaktia besonders gefährdet, sich mit HCMV zu infizieren. Die kumulative peri/postnatale Transmissionsrate der Frühgeborenen HCMV-DNALaktia positiver und/oder HCMV-

seropositiver Mütter betrug 38 % (21/55). Zwei der 22 (10 %) mit HCMV infizierten Frühgeborenen entwickelten klinische Symptome, die auf eine HCMV-Infektion zurückgeführt werden konnten. Beide Kinder wurden postnatal mit HCMV infiziert, wahrscheinlich über die DNA-laktia positive Brustmilch ihrer Mütter. Das eine Frühgeborene mit besonders geringem Geburtsgewicht (380 Gramm) entwickelte eine Thrombozytopenie mit schwerem abakteriellem „sepsis-like-syndrom“, das im Verlauf eine Reintubation erforderte (Kind 1 in Tab. 4). Bei dem zweiten Frühgeborenen konnte am Ende der 3. Lebenswoche -zwei Wochen nach dem ersten Nachweis von HCMV-DNA in der Brustmilch seiner Mutter- erstmals virale DNA in Urin und TS-Proben nachgewiesen werden. In der 4. Lebenswoche entwickelte dieses Kind eine schwere Hepatitis mit Cholestase-Ikterus, für den sonographisch und labordiagnostisch keine andere Ursache als HCMV gefunden werden konnte (Kind 9 in Tab. 4). Unter Therapie mit Ganciclovir besserte sich der Zustand beider Kinder, obgleich in ihren Urin- und TS-Proben über den gesamten weiteren Untersuchungszeitraum hohe Mengen an HCMV-DNA nachweisbar waren. Bei den weiteren 20 infizierten Kindern wurden keine eindeutig der HCMV-Infektion zuzuordnenden klinischen Symptome beobachtet.

Tab. 4: Diagnose und klinische Daten der 22 HCMV-infizierten Kinder.

Abk.: w=weiblich; m=männlich, 0= negativ; += positiv; ROP= retinopathia praematurorum; RDS= „respiratory distress syndrome“; BPD1=Bronchopulmonale Dysplasie mit Beatmungspflichtigkeit >25% am 28. Lebenstag; BPD2 = Bronchopulmonale Dysplasie mit Beatmungspflichtigkeit > 36. Gestationswoche.

AI=Ammnioninfektionssyndrom

| Infizierte Kinder<br>n = 22 | Geschlecht | Geburts-<br>gewicht<br>(g) | erster Nachweis<br>von HCMV-DNA<br>(Tage pp.) in |       | Transmission | BPD1 | BPD2 | RDS | ROP | AI | HCMV-<br>assoziierte<br>Symptome | Art der<br>Entbindung |
|-----------------------------|------------|----------------------------|--|-------|--------------|------|------|-----|-----|----|----------------------------------|-----------------------|
|                             |            |                            | Urin   | TS/PS |              |      |      |     |     |    |                                  |                       |
| 1                           | M          | 1670                       | 14   | 14    | Postnatal    | 0    | 0    | 0   | 0   | +  | Sepsis-like<br>disease           | vaginal               |
| 2                           | W          | 380                        | 28   | 28    | Postnatal    | +    | +    | +   | +   | +  |                                  | Sektio                |
| 3                           | M          | 970                        | 28   | 28    | Postnatal    | +    | +    | +   | +   | 0  |                                  | Sektio                |
| 4                           | M          | 815                        | 14   | 28    | Postnatal    | +    | +    | +   | +   | +  |                                  | Sektio                |
| 5                           | W          | 726                        | 14   | 14    | Postnatal    | 0    | 0    | 0   | 0   | 0  |                                  | Sektio                |
| 6                           | M          | 1080                       | 20   | 20    | Postnatal    | +    | 0    | +   | 0   | +  |                                  | Sektio                |
| 7                           | M          | 1186                       | 14   | 28    | Postnatal    | 0    | 0    | 0   | +   | +  |                                  | vaginal               |
| 8                           | W          | 930                        | 20   | 20    | Postnatal    | 0    | 0    | 0   | 0   | +  |                                  | Sektio                |
| 9                           | W          | 1305                       | 24   | 24    | Postnatal    | 0    | 0    | 0   | 0   | +  | Hepatitis-<br>Cholestase/Ikterus | Sektio                |
| 10                          | M          | 1670                       | 28   | 7     | Postnatal    | 0    | 0    | 0   | 0   | +  |                                  | vaginal               |
| 11                          | W          | 680                        | 14   | 28    | Postnatal    | +    | 0    | +   | 0   | 0  |                                  | Sektio                |
| 12                          | W          | 1480                       | 12   | 12    | Postnatal    | 0    | 0    | +   | 0   | 0  |                                  | Sektio                |
| 13                          | W          | 1290                       | 12   | 5     | Postnatal    | +    | +    | +   | 0   | 0  |                                  | Sektio                |
| 14                          | M          | 960                        | 5  | 12    | unbekannt    | +    | 0    | +   | +   | 0  |                                  | Sektio                |
| 15                          | W          | 730                        | 3  | 5     | unbekannt    | 0    | 0    | 0   | +   | 0  |                                  | Sektio                |
| 16                          | W          | 670                        | 7  | 5     | unbekannt    | +    | +    | +   | 0   | 0  |                                  | Sektio                |
| 17                          | M          | 2010                       | 5  | 3     | unbekannt    | 0    | 0    | +   | 0   | +  |                                  | vaginal               |
| 18                          | M          | 1070                       | 5  | 3     | unbekannt    | +    | 0    | +   | +   | +  |                                  | Sektio                |
| 19                          | M          | 1020                       | 3  | 3     | unbekannt    | 0    | 0    | +   | 0   | 0  |                                  | vaginal               |
| 20                          | W          | 960                        | 5  | 1     | unbekannt    | +    | 0    | +   | 0   | +  |                                  | vaginal               |
| 21                          | M          | 1320                       | 3  | 1     | unbekannt    | +    | 0    | 0   | 0   | 0  |                                  | Sektio                |
| 22                          | M          | 780                        | 3  | 1     | unbekannt    | 0    | 0    | 0   | 0   | 0  |                                  | Sektio                |

Vergleicht man die Gruppe der HCMV-infizierten Kinder (n = 22) mit der Gruppe der nicht infizierten Kinder (n = 67) so wird deutlich, dass sie sich im Bezug auf Gestationsalter, Geburtsmodus, Geburtsgewicht und Inzidenz von Amnioninfektionssyndromen nicht unterscheiden (Tab. 5). Es fällt jedoch auf, dass die Hälfte (11/22; 50 %) der HCMV-infizierten Kinder aber nur 39 % der uninfizierten Kinder laborparametrische Zeichen einer Neonatalinfektion (Def: GP > 1.0 mg/dl in den ersten drei Lebenstagen oder IL-6 >100 pg/ml) zeigte. HCMV-positive Kinder entwickelten darüber hinaus deutlich häufiger Funktionsstörungen der Atemwege mit Bronchopulmonaler Dysplasie BPD1 (41 % vs. 33 %), BPD2 (23 % vs. 10 %) oder „respiratory distress syndrome (RDS)“ (64 % vs. 45 %). Die Beatmungsdauer infizierter Kinder war im Mittel mit 14 Tagen deutlich länger als die für nicht infizierte Kinder mit 9 Tagen. Auch wenn sich statistisch für diese Unterschiede keine Signifikanz ergab ( $p > 0,05$ ; Mann-Whitney Test), weisen sie doch darauf hin, dass eine in der peri- und postnatalen Periode erworbene HCMV-Infektion ein ernstzunehmendes Gesundheitsrisiko insbesondere für Frühgeborene darstellen kann.

**Tab. 5: Klinische Charakteristika der peri/postnatal mit HCMV infizierten und nicht infizierten Frühgeborenen.**

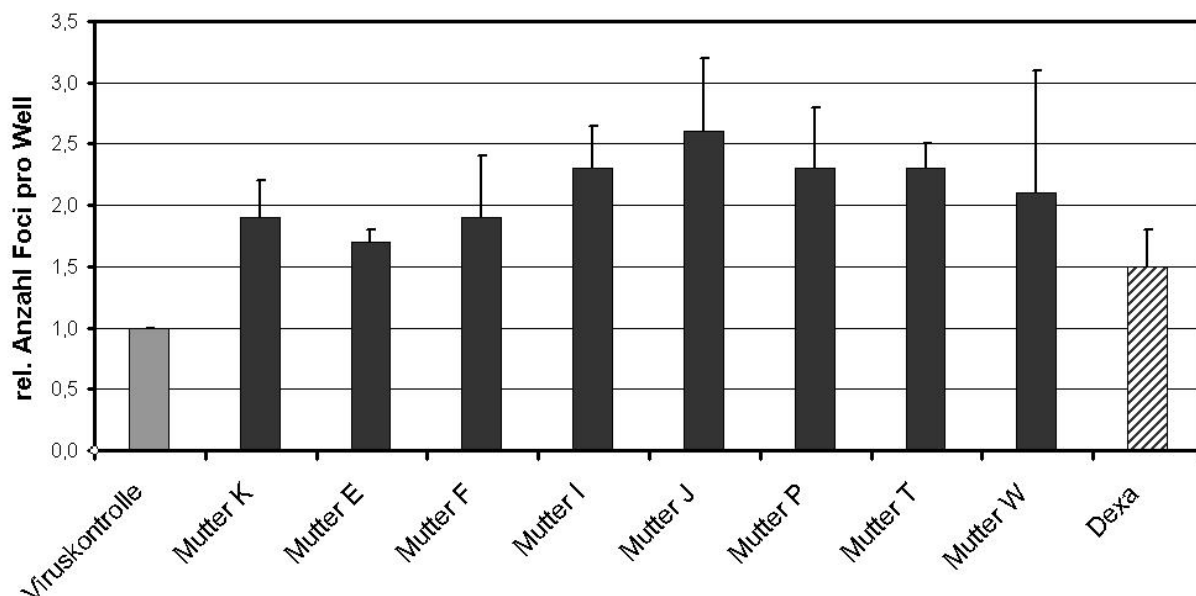
|  | <b>Anzahl der Kinder<br/>n=89</b> | <b>Nicht infizierte Kinder<br/>n=67 (75%)</b> | <b>HCMV-infizierte Kinder<br/>n=22 (25%)</b> |
|--|-----------------------------------|---|--|
| <b>Gestationsalter [Woche]</b>         | 28 (24-33)                        | 29 (24-33)                                    | 28 (24-32)                                   |
| <b>Geburtsgewicht [g]</b>              | 1119 (380-2010)                   | 1133 (390-1825)                               | 1048 (380-2010)                              |
| <b>Geschlecht [m/w]</b>                | 54 / 35                           | 42 / 25                                       | 12 / 10                                      |
| <b>Geburtsmodus [vaginal / Sektio]</b> | 26 / 63                           | 20 / 47                                       | 6 / 16                                       |
| <b>Beatmungsdauer [Tage]*</b>          | 10 (0-83)                         | 9 (0-46)                                      | 14 (0-83)                                    |
| <b>Neonatale Infektion</b>             | 37 (41 %)                         | 26 (39 %)                                     | 11 (50 %)                                    |
| <b>Amnioninfektion</b>                 | 23 (48 %)                         | 33 (49 %)                                     | 10 (45 %)                                    |
| <b>ROP</b>                             | 19 (22 %)                         | 12 (18 %)                                     | 7 (32 %)                                     |
| <b>RDS</b>                             | 44 (49 %)                         | 30 (45 %)                                     | 14 (64 %)                                    |
| <b>BPD1</b>                            | 31 (35 %)                         | 22 (33 %)                                     | 9 (41 %)                                     |
| <b>BPD2</b>                            | 12 (13.5 %)                       | 7 (10 %)                                      | 5 (23 %)                                     |

### **3.2 Einfluss von Molke auf die Virusreplikation und IE 1/2-Proteinsynthese in HCMV-infizierten HELF**

#### **3.2.1 Effekt von Molke auf die HCMV-Replikation in HELF**

Die hohe Inzidenz von 95 % HCMV-Reaktivierung in der laktierenden Brust bei seropositiven Müttern und die Beobachtung, dass es sich im Wesentlichen um einen lokalen Reaktivierungsprozess handelt, wirft die Frage auf, ob in der laktierenden Brust bioaktive Substanzen gebildet werden, die einen Einfluss auf die Reaktivierung und/oder Replikation von HCMV ausüben können. Um dies zu untersuchen, wurde aus Milchproben durch mehrere Zentrifugationsschritte fett- und zellfreie Molke präpariert. Im Standard-Plaque Test wurde der Einfluss der Molke auf die HCMV-Replikation untersucht. Hierzu wurden konfluent gewachsene HELF-Kulturen in 12-Well-Platten mit dem HCMV-Isolat AD169 infiziert ( $m.o.i = 0,02$ ) und in An- oder Abwesenheit von 110  $\mu\text{l/ml}$  Molke kultiviert. Eine detaillierte Versuchsdurchführung ist in Kap. 2.10.1 beschrieben. Die Anfärbung der infizierten Zellen 6-10 Tage nach Infektion ermöglichte die lichtmikroskopische Auswertung der typischen cytopathischen Effekte (CPE). Um den Effekt von Molke auf die Virusvermehrung quantitativ zu erfassen, wurde die Anzahl der CPE pro Well in der unbehandelten Viruskontrolle im Vergleich zu der Anzahl der CPE in den mit Molke behandelten Kulturen bestimmt. Um auszuschließen, dass eine erhöhte HCMV- Vermehrung in molkebehandelten HELF durch in der Molke vorhandenes Virus verursacht sein könnte, wurden alle Molkeproben zusätzlich auf uninfizierte HELF gegeben. Hierbei zeigte sich, dass die Molke von 2 von 10 Müttern soviel HCMV enthielt, dass es in HELF-Kulturen zur Bildung typischer CPE kam. Die Molke dieser beiden Mütter wurde von weiteren Infektionsversuchen ausgeschlossen.

Die Kultivierung der AD169-infizierten HELF mit Molke von 8 Müttern führte in allen Fällen zu einer 1,7- bis 2,6 –fachen Steigerung der Virusreplikation (Anzahl an Foci [CPE] pro Well im Vergleich zur Kontrolle) (Abb. 7). In einzelnen Experimenten mit Molke der Mütter J und W war die Anzahl der CPE im Vergleich zur Kontrolle mehr als dreifach erhöht. Zum Vergleich: Dexamethason ( $5 \times 10^{-5} \text{M}$ ) erhöhte die Plaqueanzahl im Mittel um den Faktor 1,5 im Vergleich zur Kontrolle (Abb.7).

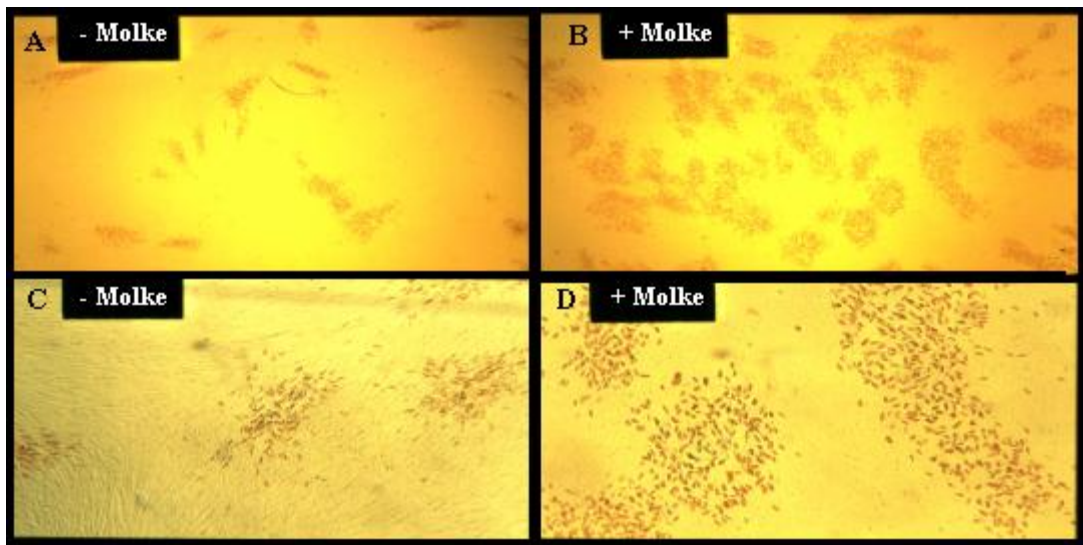


**Abb. 7: Einfluss von Molke und Dexamethason auf die HCMV-Replikation in HELF.**

Konfluente HELF-Kulturen wurden mit AD169 (m.o.i.=0,02) infiziert und in An- und Abwesenheit von Molke (110 µl/ml) von 8 verschiedenen Müttern oder Dexamethason (Dexa 5x10<sup>-5</sup>M) kultiviert. Nach Anfärbung infizierter Zellen mit dem HCMV-spezifischen Antikörperklone E13 wurde die Anzahl der Foci pro Well bestimmt. Die Anzahl der CPE in der unbehandelten Viruskontrolle wurde „1“ gesetzt. Die aufgeführten Ergebnisse sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 3 unabhängigen Experimenten.

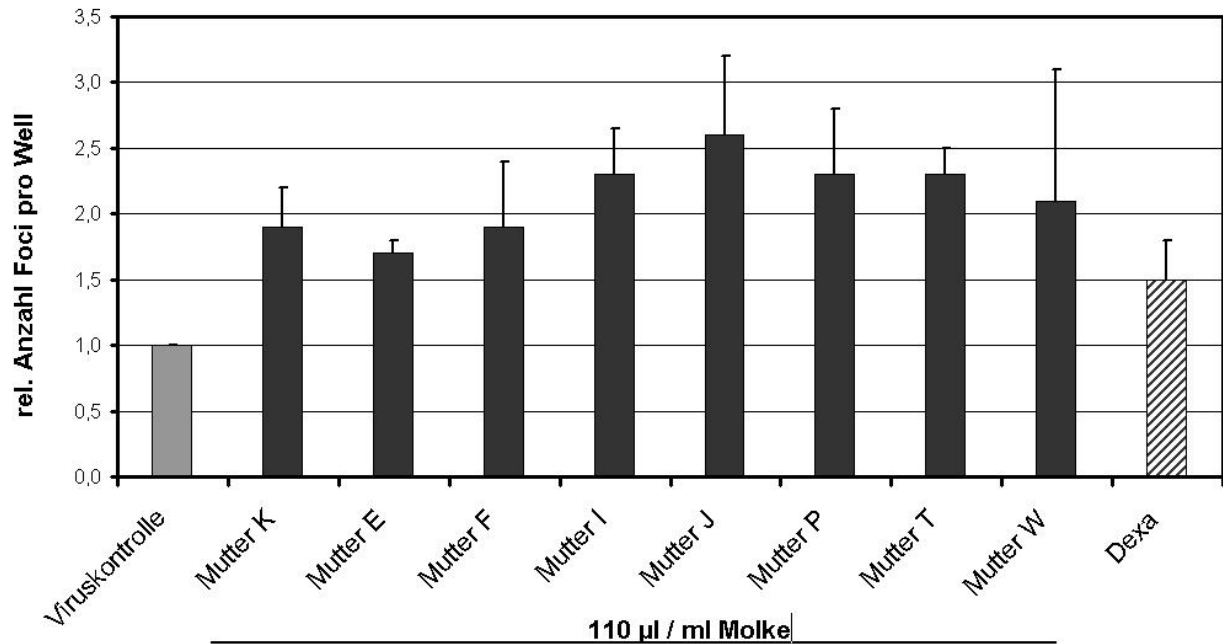
Jeder Focus entsteht aus einer initial infizierten Zelle, von der ausgehend die Virusnachkommen weitere Zellen durch direkten Kontakt infizieren. Eine freie Virusausbreitung über das Medium wird im Versuchsaufbau durch Verwendung von halbfestem Medium (MethoZell) weitestgehend verhindert. Während die Anzahl an Foci pro Well allein lediglich Rückschlüsse auf eine effizientere Viruspeneetration und/oder Initiation des Replikationszyklus ermöglicht, gibt die Größe der einzelnen Foci Aufschluss über die tatsächliche Replikationsaktivität des Virus. Wie die lichtmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 8 exemplarisch für Mutter „I“ zeigen, führt der Zusatz von Molke nicht nur zu einer erhöhten Anzahl (Abb. 8 A+B), sondern auch zu einer deutlichen Vergrößerung der cytopathischen Effekte (Abb. 8 C+D). Die durchschnittliche Größe der CPEs wurde durch Auszählung der infizierten Zellen in 5 repräsentativen CPEs quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass sich pro CPE in den mit Molke behandelten Proben durchschnittlich 1,1 - 2,6 mal so viele infizierte Zellen befanden wie in der unbehandelten Viruskontrolle (Abb.9).





**Abb. 8:** Lichtmikroskopische Aufnahme der CPEs in unbehandelten (A und C) und molkebehandelten (B und D) AD169 - infizierten HELF. Die infizierten Zellen wurden mit dem HCMV-spezifischen Antikörper E13 (Kap. 2.10.) angefärbt. A und C: 2.5-fache Vergrößerung, B und D: 10-fache Vergrößerung. Für das hier dargestellte Experiment wurde Molke der Mutter „I“ verwendet.

Unter Zugabe von Dexamethason stieg die durchschnittliche Anzahl infizierter Zellen pro CPE um das 1,8-fache im Vergleich zur Viruskontrolle. Bis auf eine Ausnahme (Muttermilch K) korrelierte die Steigerung der Anzahl CPEs (Abb. 7) mit einer erhöhten Anzahl HCMV-positiver Zellen pro CPE (Abb. 9), was auf eine erhöhte Replikationsrate bzw. -geschwindigkeit des Virus in Gegenwart von Molke schließen lässt. Molkeproben von seronegativen Müttern (F, K, P) und seropositiven Müttern (E, I, J, T, W) zeigten in diesen Experimenten keine Unterschiede.



**Abb. 9: Einfluss von Molke und Dexamethason auf die Virusausbreitung in HELF.**

HELF wurden mit AD169 (m.o.i.=0,02) infiziert und unter An- und Abwesenheit von Molke (110 µl/ml) von 8 verschiedenen Müttern oder Dexamethason (Dexa 5x10-5M) kultiviert. Nach Anfärbung infizierter Zellen mit dem anti-HCMV-AK E13 wurde die Anzahl infizierter Zellen in 5 repräsentativen CPEs ausgezählt, gemittelt und relativ zur Viruskontrolle errechnet. Hierzu wurde die Anzahl infizierter Zellen pro CPE in der unbehandelten Viruskontrolle „1“ gesetzt. Die aufgeführten Ergebnisse sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 3 unabhängigen Versuchen

### 3.2.2 Effekt von Molke auf die HCMV-Immediate Early Proteinsynthese

Mittels Westernblot Analysen wurde untersucht, welchen Einfluss Molke auf die Synthese der Immediate-Early Proteine IE1 und IE2 von HCMV AD169 in HELF hat. Hierzu wurden konfluente HELF-Kulturen mit AD169 infiziert (m.o.i.=1) und unter Zugabe von Molke (300 µl/ml) für 72 Stunden kultiviert (Kapitel 2.11.) Zum Vergleich wurden eine nichtinfizierte Zellkontrolle, eine unbehandelte Viruskontrolle, sowie eine mit Dexamethason (5x10-5M) behandelte Viruskontrolle mitgeführt. Für den Westernblot wurden je 40 µg Gesamtprotein elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Darstellung der IE-Proteine erfolgte mittels des spezifischen monoklonalen HCMV Antikörpers E13 (anti-HCMV early antigen clone E13), der die IE1- und IE2 - Proteine erkennt.

Wie der repräsentative Immunoblot in Abb. 10 A zeigt, konnte in allen infizierten Proben (Spuren 1-8) IE1- und IE2- Protein nachgewiesen werden. Die Menge von IE1-Protein (72 kDa) war in allen Proben höher als die von IE2 (86 kDa). In der unbehandelten Viruskontrolle (Spur 1) war deutlich weniger IE1- und IE2-Protein nachweisbar als in den mit verschiedenen

Molkeproben (Spur 2-7) oder Dexamethason (Spur 8) behandelten Proben. Die Menge an Aktin war in allen Proben vergleichbar, sodass Unterschiede in der aufgetragenen Gesamtproteinmenge ausgeschlossen werden konnten. In der uninfizierten Zellkontrolle (Spur 9) konnte keine HCMV-spezifischen IE-Proteine nachgewiesen werden, was Kontaminationen während des Versuches ausschließt und die Spezifität des verwendeten Antikörpers belegt.

Die Auswertung der Immunoblots mit dem Programm Chemimager V.5.5 (Alpha Ease) ermöglichte die Farbdichtemessung der angefärbten Banden im linearen ungesättigten Skanbereich. Hierdurch war eine semiquantitative Auswertung der Bandenstärke möglich. Die Bandendichten wurden gemessen und im Vergleich zur unbehandelten Viruskontrolle errechnet. Im Mittel der 3 durchgeführten Immunoblots ergab sich eine 1,6 - 2,6-fach erhöhte IE 1/2-Proteinsynthese in mit Molke kultivierten Proben im Vergleich zur unbehandelten Viruskontrolle (Abb. 10 B). Dexamethason steigerte die IE 1/2- Proteinsynthese im Mittel um den Faktor 2,7 ( $\pm 0,2$ ).

Zusammengefasst belegen diese Versuche, dass Molke die IE-Genexpression von HCMV in HELF steigert.

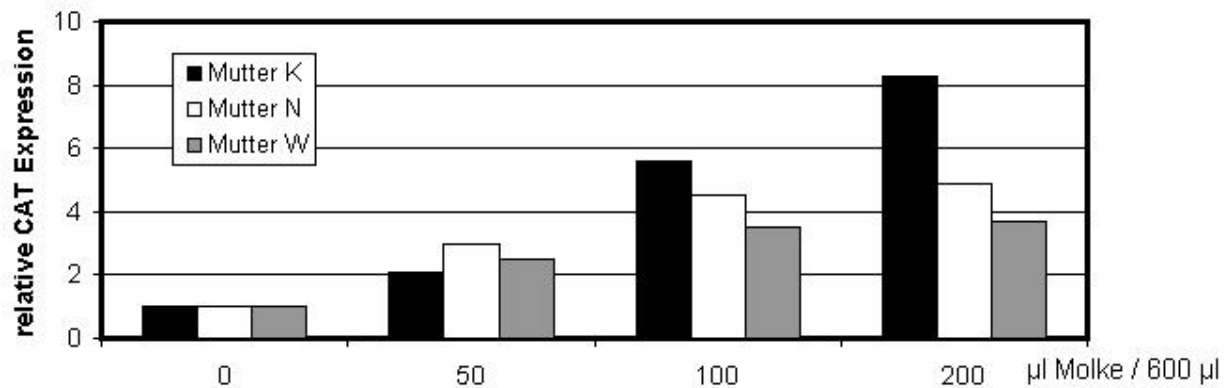


### **3.3 Einfluss von Molke auf die Aktivität des HCMV IE1/2-Enhancer/Promotors in HL-60 und THP-1 Zellen**

#### **3.3.1 Einfluss von Molke auf die Aktivität des HCMV IE1/2-Enhancer/Promotor in HL-60 und THP-1 Zellen**

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob der stimulierende Effekt von Molke auf die HCMV-Replikation und IE 1/2- Proteinsynthese auf eine erhöhte Aktivität des HCMV IE1/2-Enhancer/Promotors zurückgeführt werden kann. Der HCMV IE1/2-Enhancer/Promotor reguliert die Synthese der IE1- und IE2- Proteine (siehe Kap. 1.4.2.). Hierzu wurden HL-60 oder THP-1 Zellen als Modell für monozytäre Vorläuferzellen (HL-60) bzw. reife Monozyten (THP-1) nach der in Kap. 2.8.1. beschriebenen DEAE-Dextran Methode transient mit dem Plasmid pRR55 transfiziert. pRR55 enthält den gesamten HCMV IE1/2-Enhancer/Promotor gekoppelt an ein Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT)-Reportergen. Die transfizierten Zellen wurden 30 Stunden in An- und Abwesenheit von Molke (200 µl pro 600 µl Medium) kultiviert. Im anschließenden CAT Assay wurde die Menge der in den Zellen gebildeten Chloramphenicol-Acetyl-Transferase als Maß für die Aktivität des HCMV IE1/2-Enhancer/Promotors gemessen. Stichprobenartige Zellzählungen zeigten, dass es in mit Molke behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle zu keinem veränderten Zellwachstum kam.

Die in Abb. 11 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Molke die Aktivität des IE1/2-Enhancer/Promotor in HL-60 Zellen deutlich erhöht. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig. Die Erhöhung der zugesetzten Molkemenge von 50 µl auf 200 µl in einem Gesamtvolumen von 600 µl führte zu einer linearen Steigerung der Promotoraktivität. Die durch Molkeproben verschiedener Mütter hervorgerufenen Stimulationsraten unterschieden sich hierbei in ihrer absoluten Höhe. Bei allen Proben war eine signifikant höhere (alle Proben  $p < 0,005$ ; Wilcoxon Test) IE1/2-Enhancer/Promotoraktivität in mit Molke behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle zu sehen. Diese Beobachtung bestätigte sich in den weiter unten beschriebenen Untersuchungen zur Kinetik der molkeabhängigen Stimulation des HCMV IE1/2-Enhancer/Promotors für verschiedene Mütter.



**Abb. 11: Einfluss steigender Konzentrationen von Molke auf die CAT-Expression in pRR55 transfizierten HL-60 Zellen.**

HL-60 Zellen wurden mit pRR55 transient transfiziert und unter An- und Abwesenheit steigender Menge Molke von drei verschiedenen Müttern kultiviert. Nach 30 Stunden wurde die CAT-Expression gemessen. Die CAT-Expression in der unbehandelten Kontrolle wurde „1“ gesetzt. Dargestellt sind die relativen CAT-Expressionswerte aus 3 unabhängigen Experimenten.

Der stimulierende Einfluss von Molke auf die Aktivität des IE1/2-Enhancer/Promotors war nicht auf HL-60 Zellen beschränkt, sondern wurde auch in THP-1 Zellen beobachtet. In parallel durchgeführten Versuchen wurden gleiche Mengen von HL-60 und THP-1 Zellen mit pRR55 transfiziert und unter Zugabe der gleichen Menge Molkeprobe von unterschiedlichen Müttern kultiviert. In diesen Experimenten zeigte sich, dass die Stimulierung des IE1/2-Enhancer/Promotors durch gleiche Molkeproben in HL-60 und THP-1 Zellen nahezu identisch und damit unabhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen ist (Abb. 12).

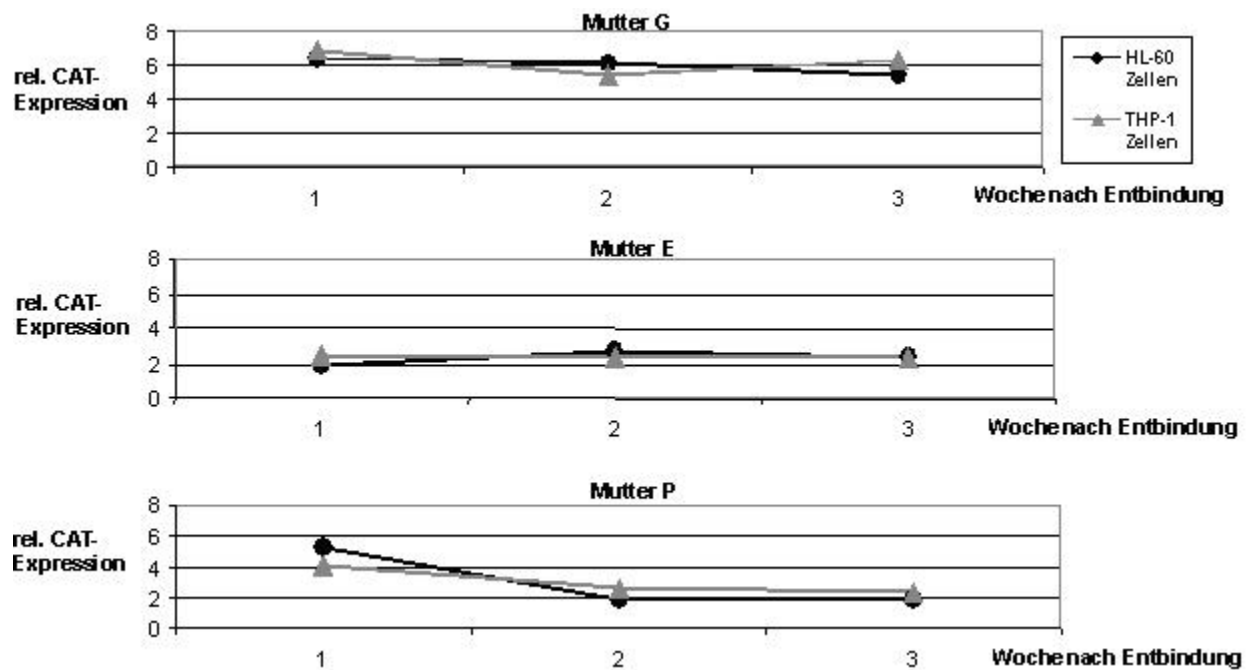


Abb. 12: Einfluss von Molke auf die CAT-Expression in pRR55-transfizierten HL-60 und THP-1 Zellen. HL-60 und THP-1 Zellen wurden parallel mit pRR55 transfiziert und unter An- und Abwesenheit identischer Molkeproben (200  $\mu$ l/600  $\mu$ l) kultiviert. Die CAT-Expression der jeweiligen unbehandelten Kontrolle wurde „1“ gesetzt. Die relativen CAT-Expressionen unter Zugabe von Molkeproben 3 verschiedener Mütter von je 3 verschiedenen Abnahmezeitpunkten sind dargestellt. Abgebildet sind die Ergebnisse von drei Einzelexperimenten.

### 3.3.2 Kinetik der Stimulation des IE1/2-Enhancer/Promotors durch Molke stillender Mütter in den ersten Monaten der Laktation

Die Virusausscheidung mit der Muttermilch beginnt in den ersten Wochen nach Entbindung, erreicht in den ersten 3-6 Wochen der Laktation ein Maximum und fällt dann langsam ab (Vochem et al., 1998; Yasuda et al., 2003). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Promotor-stimulierende Aktivität der Molke ebenfalls einer bestimmten Kinetik folgt. Dazu wurde von 10 Müttern einmal wöchentlich über 5-7 Wochen nach Entbindung Brustmilch gesammelt und der Effekt der daraus präparierten Molke auf die Aktivität des HCMV IE1/2-Enhancer/Promotors in transient transfizierten HL-60 Zellen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 13 A und B zusammengefasst.

Es zeigte sich, dass auch über einen längeren Zeitraum alle untersuchten Molkeproben die CAT-Expression in pRR55-transfizierten HL-60 Zellen steigern. Die Promotoraktivität war in Abhängigkeit von der Mutter im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um die Faktoren 1,7 ( $\pm 0,8$ ) bis 7,2 ( $\pm 2,4$ ) erhöht. Molkeproben von 7 der 10 Mütter erhöhten die Aktivität des IE1/2-Enhancer/Promotors um mehr als das Dreifache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Mütter I, D, G, N, K, P, E). Die Steigerung der IE1/2-Enhancer/Promotoraktivität durch Molke war für alle Molkeproben statistisch signifikant ( $p > 0,005$ ; Wilcoxon-Test).

Die Höhe der Stimulierung folgte dabei im Mittel einer zeitlichen Kinetik: Für alle Mütter wurden die höchsten Stimulationswerte mit Molkeproben aus den ersten beiden Wochen nach Entbindung gemessen. Danach sank der stimulierende Effekt auf ein niedrigeres, aber weiter deutlich über der Kontrolle liegendes Niveau ab, auf dem er bis zur 7. Woche verblieb.

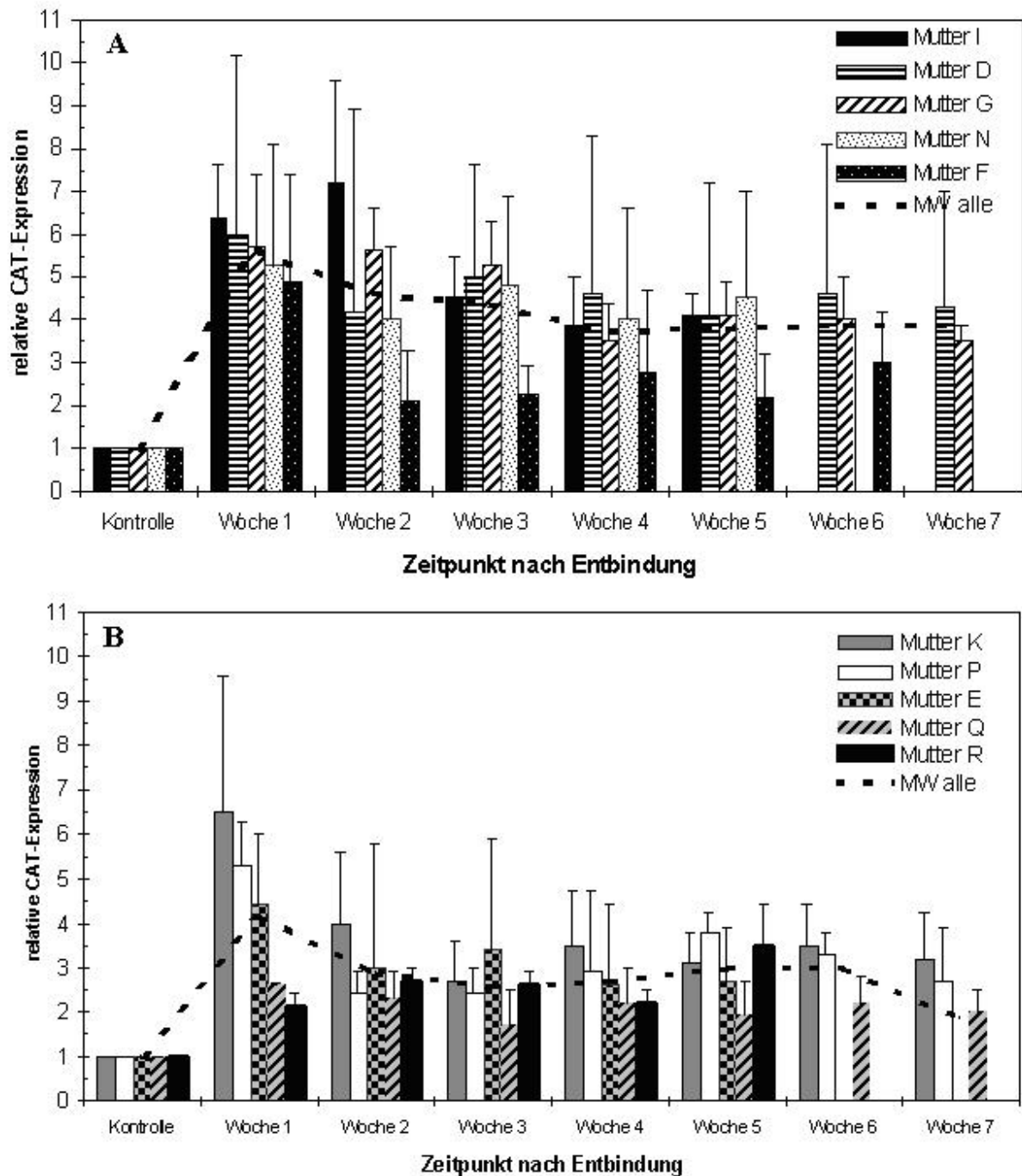
Im Mittel erhöhte Molke, die in der ersten Woche nach Entbindung gesammelt wurde, die Aktivität des IE1/2-Enhancer/Promotors um den Faktor 4,9 ( $\pm 1,5$ ). In der 2. Wochen sank dieser Faktor auf 4,5 ( $\pm 1,5$ ) und betrug in der 5. Woche nach Entbindung noch 3,5 ( $\pm 0,9$ ).

Zur statistischen Auswertung dieser Daten wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Test für gepaarte Proben verwandt, in dem Wertunterschiede zwischen gemittelten Stimulationsraten der einzelnen Wochen gegeneinander analysiert wurden. Dabei zeigte sich, dass die gemessenen Stimulationswerte für Molkeproben der 1. Woche signifikant höher waren als für die der 2. Woche ( $p = 0,024$ ), der 3. Woche ( $p = 0,007$ ), der 4. Woche ( $p < 0,001$ ) und der 5. Woche ( $p = 0,009$ ), wobei die Stimulationsrate in der 5. Woche nochmals geringfügig anstieg. Die mit Molkeproben aus der 6. und 7. Woche nach Entbindung erzielten Ergebnisse zeigten zwar weiterhin eine stimulierende Wirkung, wurden aber in die statistische Auswertung nicht einbezogen, da für diese Wochen nicht von allen 10 Müttern Proben zur Verfügung standen.



Die beobachtete Kinetik war unabhängig vom Serostatus der Mütter. Statistisch ergab sich bei separater Berechnung der molkevermittelten Stimulationskinetiken seronegativer und seropositiver Mütter kein signifikanter Unterschied. Allerdings zeigten die Molkeproben von HCMV-seropositiven Müttern (Abb. 13 A) ein im Mittel etwas stärkeren Effekt auf die IE1/2-Enhancer/Promotoraktivität als die Molken seronegativer Mütter (Abb. 13 B). Die Ursache hierfür konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Da die Experimente an verschiedenen Tagen durchgeführt werden mussten, die Zellen also nicht immer in identischem Zustand waren, ist nicht auszuschließen, dass der Zellzustand auf die absoluten Stimulationsraten einen Einfluss hatte. Wie im Kapitel Material und Methoden ausgeführt, wurden im Rahmen dieser kinetischen Untersuchungen die Molkeproben einer Mutter jeweils unter identischen Bedingungen getestet, da das primäre Ziel die Darstellung der Stimulationskinetik der Molkeproben einer Mutter im Laufe der Laktation war. Die Unterschiede in den absoluten Stimulationswerten seropositiver und seronegativer Molke könnten jedoch auch dadurch verursacht sein, dass die stimulierende Substanz in HCMV-seronegativen Müttern vermindert gebildet wird. Um Unterschiede zwischen der Molke seropositiver und seronegativer Mütter zu belegen, bedarf es weiterer Versuche, in denen die Molkeproben unterschiedlichen Mütter unter identischen Bedingungen getestet werden.

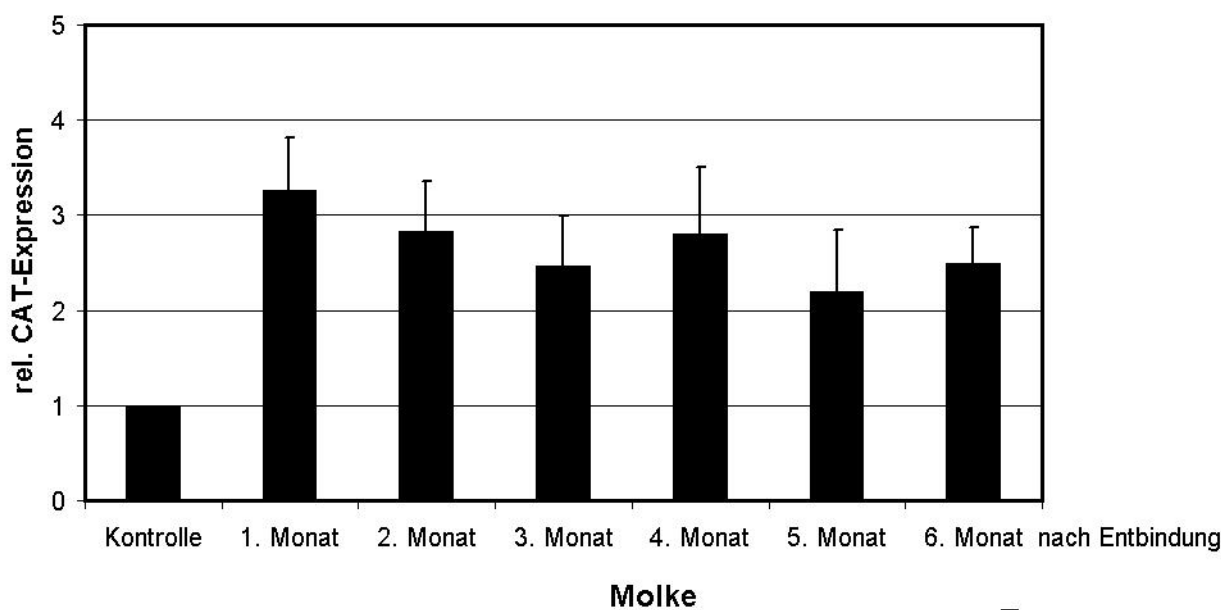
Von den 5 seropositiven Müttern, deren Molke über einen längeren Zeitraum gesammelt und im Transfektionssystem untersucht wurde, übertrugen 3 das Virus auf das Frühgeborene. Vergleiche der Stimulationskinetiken (Abb. 13 A) der Molke dieser Transmitter (Mütter G, F, N) im Vergleich zu den seropositiven Non-Transmittern (Mütter D, I) zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die gemittelten Stimulationswerte von Molkeproben aus der 1. Woche waren in der Transmittergruppe mit  $4,9 \pm 2,5$  (Mutter F),  $5,3 \pm 2,8$  (Mutter N) und  $5,7 \pm 1,7$  (Mutter G) leicht niedriger als in der Non-Transmittergruppe mit  $6,0 \pm 3,2$  (Mutter D) und  $6,4 \pm 1,2$  (Mutter I). Für eine sichere Aussage bedarf es allerdings der Untersuchung eines größeren Kollektivs an Mutter-Kind Paaren und, wie oben erwähnt, müssten die Molkeproben verschiedener Mütter unter absolut identischen Bedingungen getestet werden.



**Abb. 13:** Einfluss von Molke verschiedener Mütter auf die Aktivität des HCMV IE1/2-Enhancer/Promotors im Verlauf der Laktation

HL-60 Zellen wurden mit pRR55 transfiziert, in An- und Abwesenheit von 200 µl Molke/600 µl Medium kultiviert und die CAT-Expression nach 30 Stunden gemessen. Dargestellt sind die CAT-Expressionswerte relativ zur unbehandelten Kontrolle, die „1“ gesetzt wurde. Die Molkeproben wurden von 5 HCMV-seroPositiven (A) und 5 HCMV-seronegativen Müttern (B) während der ersten 5 bis 7 Wochen nach Entbindung gesammelt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen.

Im Rahmen der Arbeit konnten Muttermilchproben von einer Mutter eines reif geborenen Kindes über einen Zeitraum von 6 Monaten nach Entbindung gesammelt und getestet werden. Es zeigte sich, dass die den HCMV IE1/2-Enhancer/Promotor stimulierende Aktivität auch 6 Monaten nach Entbindung noch in der Brustmilch vorhanden ist (Abb. 14). Die Kinetik ist erwartungsgemäß vergleichbar derjenigen, die für Mütter frühgeborener Kinder in den ersten beiden Monaten der Laktation beobachtet wurde (vgl. Abb. 13). Der stimulierende Effekt war am höchsten in der Molke, die während der 1. Woche nach Entbindung gesammelt wurde ( $3,3 \pm 0,5$ ), und fiel dann auf ein gleichbleibendes, etwas niedrigeres Niveau ab ( $2,5 \pm 0,4$ ).



**Abb. 14: Einfluss von Molkeproben einer Mutter auf die Aktivität des IE1/2-Enhancer/Promotors im Verlauf von 6 Monaten nach Entbindung**

HL-60 Zellen wurden transient mit pRR55 transfiziert, 30 Stunden unter An- und Abwesenheit von 200 µl Molke/ 600 µl Kulturmedium kultiviert und die CAT-Expression gemessen. Molkeproben einer Mutter (Mutter W) von unterschiedlichen Abnahmezeitpunkten (1.-6. Monat der Laktation) wurden getestet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen CAT- Expressionswerte aus drei unabhängigen Versuchen.

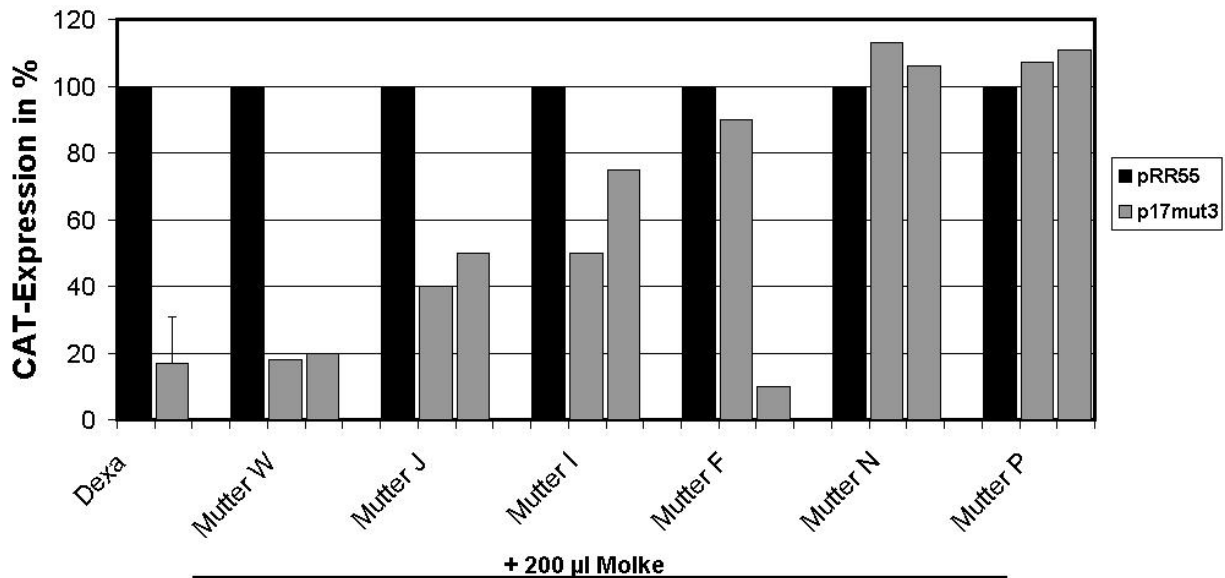
Zusammenfassend machen die Versuche deutlich, dass der stimulierende Effekt von Molke auf die Virusreplikation und IE-Proteinexpression mit einer Erhöhung der Aktivität des IE1/2-Enhancer/Promotors einhergeht. Molke muss daher eine oder mehrere Substanzen enthalten, die über eine Aktivierung des HCMV IE1/2-Enhancer/Promotors die IE-Genexpression erhöhen können. Diese Substanz(en) tritt (treten) physiologisch sowohl in seropositiven als auch seronegativen Müttern mit einer bestimmten Kinetik in der Molke auf. Ihre Konzentration ist am Anfang der Laktation am höchsten und sinkt dann auf einen etwas niedrigeren Wert, der dann über lange Zeit (wahrscheinlich die gesamte Laktation) relativ konstant bleibt.

### **3.4 Untersuchungen zum Mechanismus der Molke-vermittelten Stimulierung des HCMV IE1/2-Enhancer/Promotors**

#### **3.4.1 Untersuchungen zur Rolle von Glukokortikoiden im Prozess der molkevermittelten HCMV IE1/2-Enhancer/Promotorstimulation in HL-60 Zellen**

Die Stimulierung der Aktivität des HCMV IE1/2-Enhancer/Promotors wird durch Bindung von aktivierenden Transkriptionsfaktoren an unikale oder repetitive Sequenzen im Enhancer hervorgerufen (Mocarski et al., 2002). Um den Mechanismus der IE-Promotorstimulation durch Molke genauer zu untersuchen und Hinweise auf die Natur und den Wirkmechanismus der verursachenden Substanz(en) zu gewinnen, wurden Zellen mit drei verschiedenen Promotormutanten transfiziert und unter Zugabe von Molke kultiviert.

In dem Plasmid p17mut3 sind die 17 bp Sequenzmotive durch Nukleotidaustausch so verändert, dass sie den Glukokortikoidrezeptor nicht mehr binden können (Prösch et al., eingereicht). Um zu prüfen, ob Glukokortikoide eine Rolle für die Molke-vermittelte Stimulation des IE1/2-Enhancer/Promotors spielen, wurden HL-60 Zellen parallel mit dem Wildtyp Promotor pRR55 oder p17mut3 transfiziert und unter Zugabe gleicher Molkeproben kultiviert. Zur Kontrolle wurde eine parallel transfizierte Kultur mit Dexamethason ( $5 \times 10^{-6} \text{M}$ ) behandelt. Wie Abbildung 15 zeigt, führte die Zugabe von Dexamethason zu einer durchschnittlichen Steigerung der Wildtyp Promotoraktivität um den Faktor 2,2 ( $\pm 0,6$ ). Im Unterschied dazu reagierte der mutierte Promotor in p17mut3 nicht mehr oder nur noch marginal auf gleiche Mengen Dexamethason. Dies entspricht einer Verminderung der Dexamethason-induzierten Promotorstimulation um 83 % im Vergleich zum Wildtyppromotor. Nach Behandlung p17mut3-transfizierter HL-60 Zellen mit Molkeproben von 6 verschiedenen Müttern zeigte sich, dass die Promotormutante auf 4 der 6 Molken deutlich geringer reagierte als der Wildtyppromotor (Abb. 15). Im Vergleich zum Wildtyppromotor waren die Stimulierungsraten in mit der Promotormutante p17mut3 transfizierten Zellen um 10-90 % reduziert (Mütter W, J, I, F). Ein vollständiger Verlust der stimulierenden Wirkung von Molke auf den IE1/2-Enhancer/Promotor nach Eliminierung der GR-bindenden Sequenzen wurde jedoch nicht beobachtet. Diese Versuchsergebnisse zeigen, dass das 17 bp Motiv des IE1/2-Enhancers und Glukokortikoide eine wichtige Rolle in der Vermittlung der molkeinduzierten IE1/2-Enhancer/Promotorstimulation spielen.

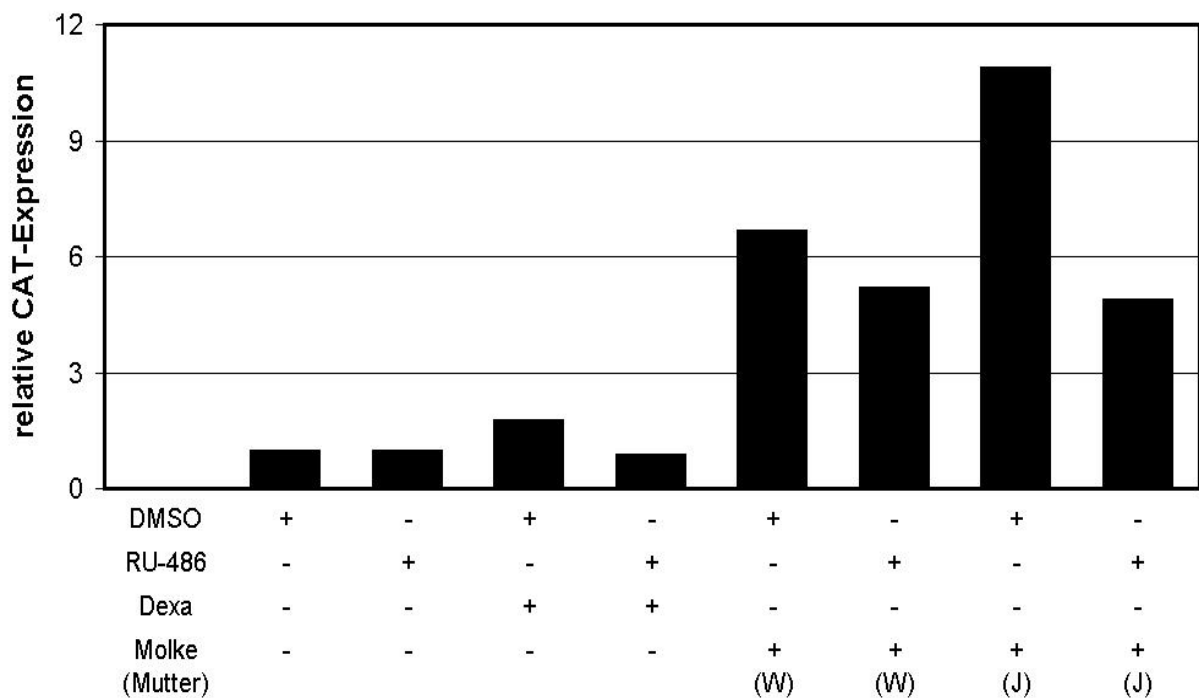


**Abb. 15:** CAT-Expression in pRR55 und p17mut3 transfizierten HL-60 Zellen nach Behandlung mit Molke. HL-60 Zellen wurden parallel mit pRR55 und p17mut3 transfiziert und mit 200 µl Molke/600 µl Medium bzw.  $5 \times 10^{-6}$  M Dexamethason (Dexa) kultiviert. Nach 30 Stunden wurde die Promotoraktivität im CAT-Assay gemessen und relativ zur unbehandelten Kontrolle errechnet. Zur vergleichenden Darstellung der Aktivität beider Promotorkonstrukte nach Behandlung mit Molke wurde die in pRR55-transfizierten HL-60 Zellen gemessene CAT-Expression 100% gesetzt (schwarze Säulen). Die Abbildung zeigt je 2 unabhängige Versuche pro Molkeprobe bzw. Mittelwerte und Standardabweichung aus 7 unabhängigen Versuchen (Dexa).

In einem weiteren Ansatz wurde auf andere Weise überprüft, ob Glukokortikoide tatsächlich an der Stimulation der IE1/2-Enhancer/Promotoraktivität durch Molke direkt beteiligt sind. Hierzu wurden in einem pRR55-transfizierte HL-60 Zellen mit Molke unter Zugabe von RU-486, einem Inhibitor des Glukokortikoidrezeptors, inkubiert. Für diese Experimente wurden diejenigen Molkeproben verwendet, für die in p17mut3- versus pRR55-transfizierten HL-60 Zellen eine deutlich verringerte promotorstimulierende Aktivität nachgewiesen worden war (Abb. 15, Molke Mütter W + J). Zur Kontrolle wurden pRR55-transfizierten HL-60 Zellen mit Dexamethason ( $5 \times 10^{-6}$  M) oder mit RU-486 (5 ng/ml) behandelt. Hierdurch sollte zunächst abgesichert werden, dass RU-486 die transkriptionsaktivierende Eigenschaft von Dexamethason hemmt. Da DMSO, als Lösungsmittel für RU-486 selbst die Aktivität des HCMV IE1/2-Enhancer/Promotor minimal beeinflusst, wurde allen Kontrollen die adäquate Menge DMSO zugesetzt.

Wie in Abb. 16 dargestellt, antagonisierte RU-486 die durch Dexamethason hervorgerufene Stimulation des Promotors vollständig. In Gegenwart von RU-486 sank die Aktivität des IE1/2-Enhancer/Promotors sogar unter die in Abwesenheit von Dexamethason gemessene Basisaktivität. Die durch die beiden Molkeproben „W“ und „J“ hervorgerufene

Promotorstimulation in pRR55-transfizierten HL-60 Zellen wurde durch Zugabe von RU-486 in 3 unabhängigen Versuchen im Mittel um 32 % (Molke W) bzw. 61 % (Molke J) gesenkt. RU-486 hatte damit einen ähnlichen, wenn auch etwas schwächeren Hemmeffekt auf die molke-induzierte Stimulation des IE1/2-Enhancer/Promotors als die Eliminierung der Bindungsstellen des Glukokortikoidrezeptors im IE-Enhancer (vgl. Abb. 15). Einschränkend muss aber angemerkt werde, dass wegen der Gefahr von toxischen Einflüssen keine höheren Mengen RU-486 eingesetzt wurden. Es könnte daher sein, dass höhere Mengen an RU-486 zu ähnlichen Ergebnissen geführt hätten wie bei Verwendung der Promotormutante p17mut3.



**Abb. 16: Antagonisierender Effekt von RU-486 auf die CAT-Expression in Dexamethason- und Molke - behandelten pRR55-transfizierten HL-60 Zellen.**

Mit pRR55 transfizierte HL-60 Zellen wurden unter Zugabe von 200 µl /600 µl Molke oder 5x10<sup>-6</sup>M Dexamethason (Dexa) mit 3 µl DMSO oder 3 µl RU-486 (5 mg/ml DMSO) kultiviert. Nach 30 Stunden wurde die CAT-Expression gemessen und die relative CAT-Expression errechnet. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von 3 unabhängigen Experimenten mit Molkeproben der Mütter W und J.

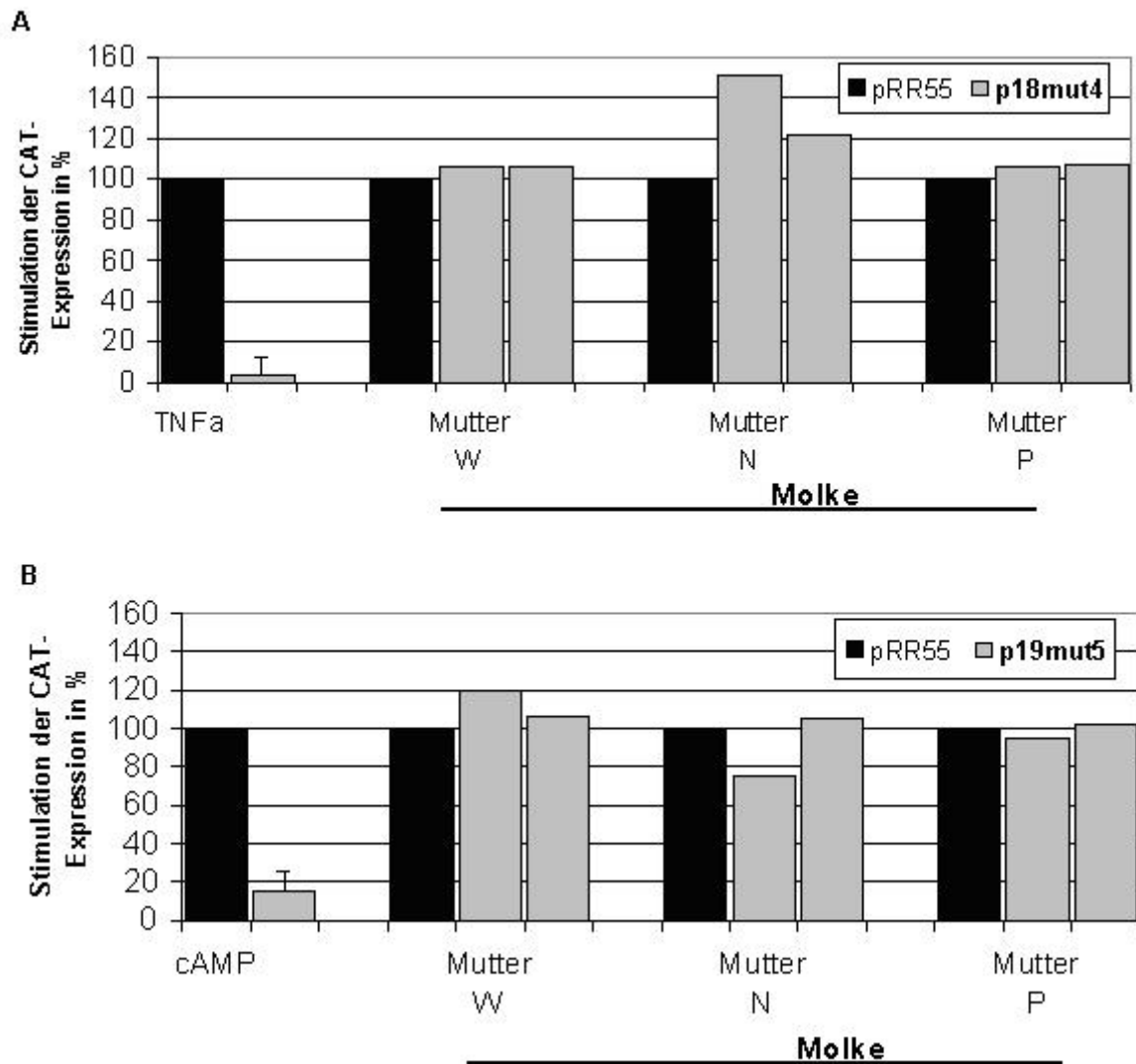
### 3.4.2 Untersuchung zur Rolle von $\text{TNF}\alpha$ und cAMP im Prozess der molkevermittelten HCMV IE1/2-Enhancer/Promotorstimulation in HL-60 Zellen

Wie im Kapitel 3.4.1. beschrieben, führte das funktionelle Ausschalten der GRE-Sequenzmotive im IE-Enhancer zu einer deutlich reduzierten Ansprechbarkeit des IE1/2-Promotors auf den stimulierenden Einfluss durch Molke. Eine vollständige Aufhebung der Molke-vermittelten IE1/2-Enhancer/Promotorstimulation wurde dabei allerdings nicht beobachtet. Es ist daher anzunehmen, dass weitere Substanzen und Transkriptionsfaktoren an diesem Prozess beteiligt sind. In den folgenden Versuchen sollte geprüft werden, ob Tumor Nekrose Faktor Alpha ( $\text{TNF}\alpha$ ) und zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) an der Molke-vermittelten IE1/2-Enhancer/Promotor-Stimulation beteiligt sind. Sowohl für  $\text{TNF}\alpha$  als auch für cAMP wurde gezeigt, dass sie die IE1/2-Enhancer/Promotoraktivität stimulieren (Prösch et al., 2000 b; Stein et al., 1993).  $\text{TNF}\alpha$  wird bei Entzündungsreaktionen gebildet und wurde in unterschiedlichen Mengen in der Molke gemessen (Buescher et al., 2001; Laiho et al., 2003). cAMP wird durch die Stresshormone Adrenalin und Noradrenalin induziert, ebenso wie durch das in der Molke nachgewiesene Prostaglandin E2 (Rodriguez-Palmero et al., 1999).

In der Promotormutante p18mut4 sind die vier 18 bp Sequenzmotive im IE1/2-Enhancer mutiert. Dies führt dazu, dass sie den Transkriptionsfaktor „Nuklear Faktor Kappa B“ ( $\text{NF}\kappa\text{B}$ ) nicht mehr binden können. Der mutierte Promotor ist nicht mehr durch  $\text{TNF}\alpha$  stimulierbar (Abb. 17 A). In der Enhancermutante p19mut5 wurden in den fünf 19 bp Sequenzmotiven Nuklotidaustausche vorgenommen, die eine Bindung des „cAMP responsive element binding protein / activating transcription factor-1 (CREB/ATF-1) an die “cAMP-responsive elements“ (CRE) verhindern (Ozar Jasmin, 2002). Diese Promotormutante zeigt in HL-60 Zellen eine stark verminderte Ansprechbarkeit auf cAMP (Abb. 17 B).

Wurden HL-60 Zellen parallel mit pRR55, p18mut4 oder p19mut5 transfiziert und mit der selben Molkeprobe behandelt, beobachteten wir eine nahezu identische CAT-Expression in allen Zellkulturen (Abb. 17 A+B). Die CAT-Expression in mit p18mut4 transfizierten HL-60 Zellen wurde durch die Molke von einer Mutter sogar stärker stimuliert (120-151 %) als in den mit pRR55 transfizierten Zellen (Abb. 17 A).

Diese Versuche zeigen, dass der stimulierende Effekt der Molke auf die Aktivität des HCMV IE1/2-Enhancer/Promotors nicht über  $\text{TNF}\alpha/\text{NF}\kappa\text{B}$  oder Substanzen vermittelt wird, die den endogenen cAMP-Spiegel erhöhen (z.B. Adrenalin, Noradrenalin, Prostaglandin E2).



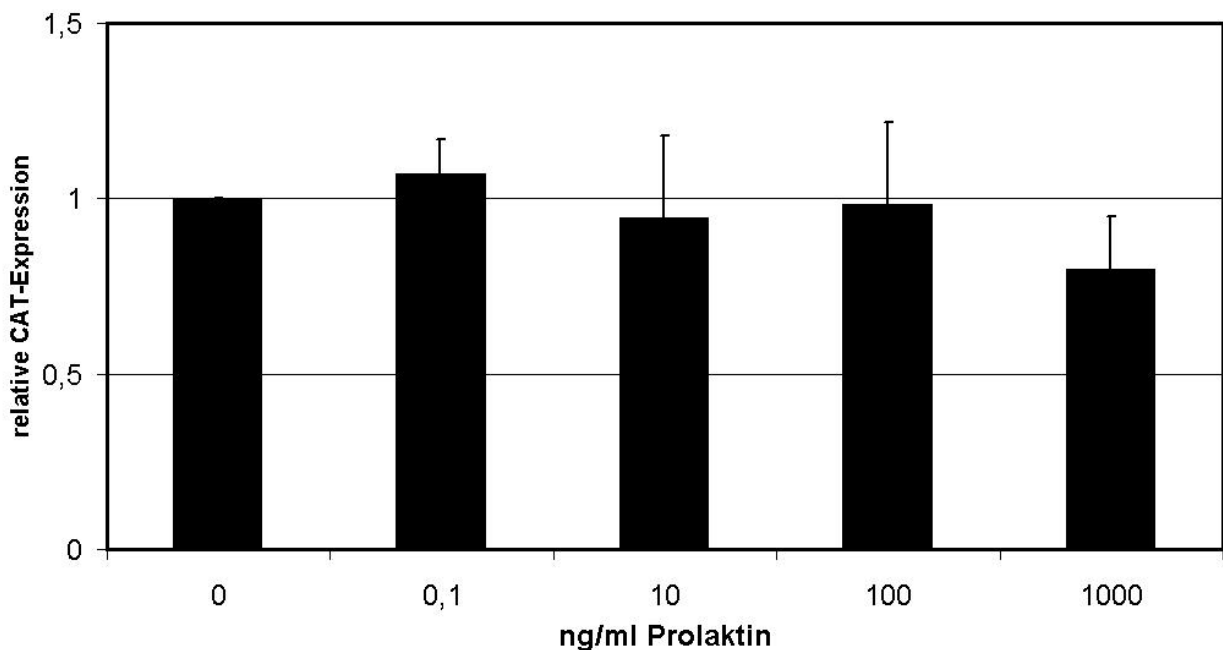
**Abb. 17: CAT-Expression in pRR55 und p18mut4 (A) oder p19mut5 (B) transfizierten HL-60 Zellen nach Behandlung mit Molke.**

HL-60 Zellen wurden parallel mit pRR55 und den HCMV IE-Promotormutanten p18mut4 (A) oder p19mut5 (B) transfiziert und in Ab- oder Anwesenheit von 200µl Molke/600 µl Medium, 5 ng/ml TNFα oder 0,5 mg/ml dbcAMP kultiviert. Nach 30 Stunden wurde die CAT-Expression gemessen und die Stimulationsraten als Verhältnis der CAT-Expression in unbehandelten und behandelten Proben errechnet. Die Stimulierung des Wildtyp Promotors (pRR55) durch cAMP, TNFα oder Molke wurde 100 % gesetzt (schwarze Säulen). Die in den mit p18mut4 und p19mut5 transfizierten und mit gleichen Molkeproben behandelten Zellen gemessene CAT-Expression ist in Prozent relativ zur CAT-Expression in den mit pRR55 transfizierten Zellen angegeben. Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardabweichung aus 7 unabhängigen Versuchen (cAMP, TNFα) bzw. die Werte aus zwei unabhängigen Versuchen pro Molkeprobe.



### 3.4.3 Einfluss von humanem Prolaktin und Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) auf die Aktivität des HCMV IE1/2-Enhancer/Promotors in HL-60 Zellen

Auf der Suche nach weiteren möglichen Mediatoren, welche die beobachtete Erhöhung der HCMV-Replikation und der IE1/2-Enhancer/Promotoraktivität durch Molke vermitteln könnten, wurde der Einfluss von Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) und humanem Prolaktin auf den IE1/2-Enhancer/Promotor untersucht. Muttermilch enthält 0,8-1,8 µg/ml EGF und 11-43 ng/ml Prolaktin (Cox et al., 1996; Dvorak et al., 2003; Ho et al., 1991). Verschiedene Arbeitsgruppen hatten Prolaktinrezeptoren auf HL-60 Zellen beschrieben (Dardenne et al., 1994; Nishiguchi et al., 1993). HL-60 Zellen wurden mit pRR55 transfiziert und unter An- und Abwesenheit steigender Konzentrationen von humanem Prolaktin kultiviert. In diesen Experimenten hatte Prolaktin in Konzentrationen von 0,1 - 1000 ng/ml keinen messbaren Einfluss auf die Promotoraktivität (Abb. 18).



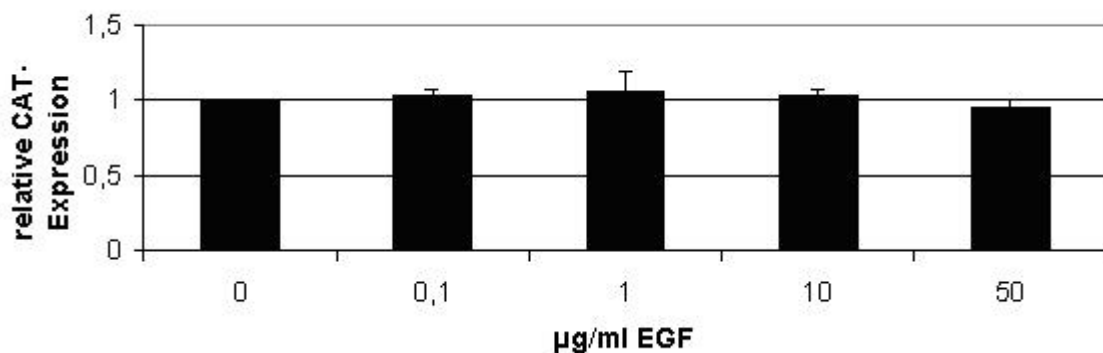
**Abb. 18:** Einfluss von Prolaktin auf die IE1/2-Enhancer/Promotoraktivität in pRR55-transfizierten HL-60 Zellen.

HL-60 Zellen wurden mit pRR55 transient transfiziert und in Anwesenheit steigender Konzentrationen Prolaktin für 30 Stunden inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der CAT-Expression relativ zur unbehandelten Kontrolle ("1") aus drei unabhängigen Versuchen.

Um zu prüfen, ob die von uns verwendeten HL-60 Zellen tatsächlich auf Prolaktin reagieren können, wurden HL-60 Zellen mit dem als prolaktinsensitiv beschriebenen Plasmid p $\beta$ c-344/-1CAT transfiziert (Doppler et al., 1995). Dieses Plasmid enthält den Ratten  $\beta$ -Kasein

Promotor stromabwärts vom CAT-Reportergen. Die basale CAT-Expression in mit p $\beta$ c-344/-1CAT transfizierten HL-60 Zellen war nach Verwendung der DEAE-Dextranmethode jedoch zu gering, um auswertbare Ergebnisse zu erhalten. Deshalb wurden die Zellen in weiteren Versuchen mittels Elektroporation transfiziert, wodurch eine höhere Transfektionseffizienz ( $\approx 50\%$ ) erreicht werden konnte. Die basale CAT-Expression nach Elektroporation war höher, wurde durch Zugabe von Prolaktin jedoch nicht weiter erhöht (nicht dargestellt). Es muss daher hinterfragt werden, ob auf den verwendeten HL-60 Zellen tatsächlich Prolaktinrezeptoren exprimiert werden. Auch die Kultivierung pRR55 transfizierter HL-60 Zellen mit EGF zeigte im untersuchten Konzentrationsbereich von 0,1-50  $\mu\text{g/ml}$  keinen Einfluss auf die Aktivität des IE1/2-Enhancer/Promotors (Abb. 19). EGF-Rezeptoren wurden auf monozytären Zellen (HL-60 und U 937) beschrieben (Eales-Reynolds et al., 2001; Taetle et al., 1991). Diese Angabe wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht verifiziert.

Eine aktive Rolle von Prolaktin oder EGF an der durch Molke in unserem HL-60 Transfektionssystem beobachteten Stimulation des IE1/2-Enhancer/Promotors erscheint unwahrscheinlich, auch wenn ein genereller Einfluss von Prolaktin oder EGF auf den IE1/2-Enhancer/Promotor in anderen Zellsystemen damit nicht ausgeschlossen werden kann.



**Abb. 19: Einfluss des Epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) auf die IE1/2-Enhancer/Promotoraktivität in pRR55-transfizierten HL-60 Zellen.**

HL-60 Zellen wurden transient mit pRR55 transfiziert und in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen EGF für 30 Stunden inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der CAT-Expression relativ zur unbehandelten Kontrolle ("1") aus drei unabhängigen Versuchen.

## 4 Diskussion

### 4.1 HCMV-Reaktivierung in stillenden Müttern und Übertragung auf Frühgeborene

Infektionen mit HCMV sind die häufigste Ursache kongenitaler Virusinfektionen (Pass et al., 2001). Während sie in der Mehrzahl der Fälle asymptomatisch verlaufen, entwickeln 10 % der kongenital infizierten Neugeborenen eine symptomatische HCMV-Infektion mit zum Teil schweren Akutsymptomen (Petechien, Ikterus, Hepatosplenomegalie, Hypotonie, Krämpfe) und chronischen Komplikationen wie Hörverlust und mentalen Entwicklungsstörungen (Boppana et al., 1992; Pass et al., 1980; Peckham et al., 1991; Ramsey et al., 1991; Vochem et al., 2003). Das Risiko einer intrauterinen Virusübertragung auf das Kind ist bei Primärinfektion der Mutter während der Schwangerschaft dreifach höher (3 % der Fälle) als bei Reinfektion/Reaktivierung (1 %). Für Kinder HCMV-seronegativer Mütter besteht daher das größte Risiko für eine intrauterine Virusübertragung während der Schwangerschaft.

Mütter mit HCMV-seropositivem Antikörperstatus übertragen das Virus hingegen in hohem Maße postnatal auf das Neugeborene – hauptsächlich über infizierte Muttermilch (Asanuma et al., 1996; Bryant et al., 2002; Hamprecht et al., 2001; Mosca et al., 2001; Vochem et al., 2003). Eine effiziente HCMV-Reaktivierung des latenten Virus zu Beginn der Laktation in der Brust scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen (Bryant et al., 2002; Hamprecht et al., 2001; Numazaki et al., 1997). Der Mechanismus dieses Prozesses ist noch gänzlich ungeklärt. Reife Neugeborene erkranken nur sehr selten symptomatisch an einer postnatal akquirierten HCMV-Infektion, während das Risiko einer symptomatischen postnatalen HCMV-Infektion für sehr kleine Frühgeborene (Def. siehe Kap. 2.5.1.) deutlich erhöht ist (Hamprecht et al., 2001; Hamprecht et al., 2000; Maschmann et al., 2001). Ausgeprägte Neutropenien, Thrombozytopenien sowie im Vergleich zu nicht HCMV-infizierten Frühgeborenen ein deutlich längerer Sauerstoffbedarf wurden beschrieben (Kumar et al., 1984; Maschmann et al., 2001; Paryani et al., 1985; Yeager et al., 1983). Yeager beobachtete einen Zusammenhang zwischen HCMV-Infektionen und Entstehung einer Brochopulmonalen Dysplasie (BPD) bei Frühgeborenen. Obwohl in einer in unserem Institut durchgeführten Studie dieser Zusammenhang statistisch nicht belegt werden konnte, zeigte die Studie, dass HCMV-Infektionen ein deutlicher Risikofaktor für die Entstehung der BPD sind (Prösch et al., 2002 b).

Die erhöhte Rate an HCMV-Infektionen in Frühgeborenen dürfte damit im Zusammenhang stehen, dass das Immunsystem von sehr kleinen Frühgeborenen noch unzureichend entwickelt

ist. Zudem gibt es Hinweise, wonach die mütterliche Leihimmunität bei Frühgeborenen weniger ausgebildet ist. Zwar werden insbesondere in den ersten Tagen nach Entbindung hohe Mengen sekretorisches Anti-HCMV IgA in die Milch ausgeschieden, doch dieses gelangt, anders als bei den meisten Tierspezies, nicht in den kindlichen Blutkreislauf (Dworsky et al., 1983; Hanson et al., 1998; Numazaki et al., 1997; Van de Perre et al., 2003). Systemisch neutralisierende IgG Antikörper der Mutter schützen das Neugeborene erst nach der 28. Schwangerschaftswoche (Bryant et al., 2002; Dworsky et al., 1983), und die im kindlichen Organismus gemessenen HCMV IgG-Titer fallen bei unreifen erkrankten Frühgeborenen deutlich schneller ab als in erkrankten reifgeborenen Kindern (Yeager et al., 1983).

In unserer zweiteiligen prospektiven Studie mit 73 Müttern und ihren 89 frühgeborenen Kindern konnten wir zeigen, dass unabhängig vom Serostatus 66 % (48/73) der Mütter frühgeborener Kinder HCMV mit der Muttermilch ausschieden. Diese Prozentzahl entspricht in etwa der in Deutschland ermittelten HCMV-Seroprävalenz von 60-70 % der deutschen Bevölkerung (Döcke et al., 1994). Berücksichtigt man den HCMV-Serostatus der untersuchten Mütter, so bestätigte sich, dass eine Reaktivierung des Virus in nahezu allen seropositiven Müttern (95 %) stattfindet. Damit stimmen unsere Daten mit der bisher größten Studie von Hamprecht und Mitarbeiter in Tübingen (2001) überein. Hier wurde HCMV-DNALaktia bei 50 % aller und 96 % der HCMV-seropositiven Mütter nachgewiesen. Studien aus Japan beschreiben eine teils niedrigere Inzidenz von DNALaktia in 40-70 % aller und in 67-92 % der seropositiven Mütter (Asanuma et al., 1996; Hotsubo et al., 1994; Mosca et al., 2001; Yasuda et al., 2003). Im Unterschied zu unserer und der Tübinger Studie wurde in den japanischen Studien unfractionierte Brustmilch in der PCR eingesetzt. Der Nachweis von HCMV-DNA aus unfractionierter Brustmilch im Vergleich zu zellfreier Molke hat sich als weniger sensitiv herausgestellt (die untere Detektionsgrenze ist doppelt so hoch wie in zellfreier fettreduzierter Molke), da Lipid-Komponenten in der nativen Brustmilch die Taq-Polymerase hemmen können (Hamprecht et al., 1998 b). Bei gleichen Untersuchungsmethoden wäre bei der japanischen Bevölkerung sogar eine noch höhere Inzidenz von HCMV-Reaktivierung denkbar, da hier die HCMV-Seroprävalenz bis zu 90 % beträgt (Asanuma et al., 1996). In einigen Studien gelang es, in 30 – 60 % der Muttermilchproben seropositiver Mütter HCMV anzuzüchten (Ahlfors et al., 1999; Hamprecht et al., 2001; Hotsubo et al., 1994). Das zeigt, dass replikationskompetentes, infektiöses Virus in der Molke in zellfreier Form vorliegt. Für die im Vergleich zur PCR-Analyse höhere Nachweisgrenze der Virusanzucht kann neben der geringeren Sensitivität der Methode auch die Anwesenheit von neutralisierendem sekretorischem HCMV IgA und unspezifischeren antimikrobiellen Substanzen (z.B. Laktoferrin, Lysozym, Vitamin A) in der Milch verantwortlich sein. Sekretorisches HCMV-IgA kann

milcheigenes HCMV neutralisieren (Alford et al., 1991). Laktoferrin hingegen behindert die Adsorption von HCMV an der Zielzelle (Harmsen et al., 1995). In der hier diskutierten Studie waren Versuche zur Virusanzucht aufgrund zu geringer Mengen an Muttermilch leider nicht möglich.

In den bisher veröffentlichten Studien wurde ausschließlich bei HCMV-seropositiven Müttern eine HCMV DNA-laktia und/oder Virolaktia beobachtet (Ahlfors et al., 1999; Asanuma et al., 1996; Hamprecht et al., 2001; Hotsubo et al., 1994; Mosca et al., 2001; Yasuda et al., 2003). In dem von uns untersuchten Kollektiv von Müttern beobachteten wir erstmals bei einer von 8 HCMV seronegativen Müttern eine HCMV-DNA-laktia. Interessanterweise übertrug diese Mutter das Virus postnatal auf ihr Neugeborenes, wodurch eine Kontamination der gewonnenen Milchproben zusätzlich ausgeschlossen werden kann. Der Nachweis von HCMV-DNA in HCMV-seronegativen Blutspendern betrug in einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe bei Verwendung der gleichen hochsensitiven PCR 5-10 % (Döcke et al., 1994). Larrson und Mitarbeiter (1998) wiesen bei 14 % der HCMV-seronegativen Blutspender HCMV-DNA in PBMCs nach. Wurden aus den PBMC die Blutmonozyten durch Adhärenz an Plastikoberflächen isoliert, erhöhte sich die Detektionsrate sogar von 14 % auf 55 %. In der Transplantationsmedizin werden seit längerem Virustransmissionen durch HCMV-seronegative Blutprodukte auf seronegative Empfänger berichtet (Miller et al., 1991) und in *in vitro* Versuchen wurde HCMV in PBMCs HCMV-seronegativer Spender reaktiviert (Soderberg-Naucler et al., 1997). Die allgemein zur HCMV-Diagnostik verwendeten ELISA wurden auf der Basis des Laborstammes AD169 entwickelt. Spezielle ELISA, die gegen Antigene klinischer Virusstämme gerichtet sind, zeigten in der Arbeit von Rabar (Rahbar et al., 2004) in 36 % HCMV-spezifische Antikörper im Blut zuvor seronegativ getesteter Blutspender. Diese Beobachtungen unterstreichen die Annahme, dass es einige HCMV-Träger gibt, die bei Infektion nicht serokonvertieren oder deren HCMV Antikörper mit den herkömmlichen ELISA (Medac, Sorin) nicht detektierbar sind.

HCMV Transmission auf das Frühgeborene wurde in unserer Studie bei 22 / 89 (24 %) der untersuchten Kinder durch wiederholten Nachweis viraler DNA in unterschiedlichen Proben nachgewiesen. Bei weiteren drei Frühgeborenen von zwei Müttern wurde eine pränatale HCMV-Infektion bestätigt. Unter Ausschluss dieser Kinder wurden 21 von 55 Frühgeborenen, die einem erhöhten Transmissionsrisiko durch die Mütter ausgesetzt waren (HCMV-Virolaktia und/oder -Seropositivität der Mutter), peri/postnatal infiziert. Daraus ergibt sich eine *kumulative* Transmissionrate von 38 %. Diese ist vergleichbar mit der Tübinger Studie (37 %), in der der Virusnachweis ebenfalls mittels PCR in zellfreier Molke erfolgte (Hamprecht et al., 2001). In

zwei ähnlich aufgebauten japanischen Studien wurden kumulative Transmissionsraten von 10 % und 25 % bestimmt (Mosca et al., 2001; Yasuda et al., 2003). Diese geringeren Übertragungsraten sind darauf zurückzuführen, dass die Muttermilch in diesen Studien vor dem Füttern routinemäßig für mehrere Tage bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren wurde (Mosca et al., 2001; Yasuda et al., 2003), oder die Kinder prophylaktisch hochdosiert mit Hyperimmunglobulin behandelt wurden (Mosca et al., 2001; Yasuda et al., 2003). Sowohl in Tübingen als auch bei uns in der Neonatologie wurde die Milch vor Verabreichung lediglich für maximal 12 Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$ - $10^{\circ}\text{C}$  gekühlt aufbewahrt.

Eine immer wieder diskutierte Frage ist die Rolle von Muttermilch als Überträgermedium von HCMV auf das Frühgeborene. In unserer Studie wurden 21 der 22 infizierten Kinder (94 %) mit virushaltiger Milch gefüttert. Für 12 der 21 Kindern konnte eine postnatale Infektion nachgewiesen werden. Für sie ist eine Infektion über virushaltigen Muttermilch hoch wahrscheinlich. Bei einem weiteren postnatal infizierten Kind (eines Zwillingspaares) konnte über den gesamten Untersuchungszeitraum keine HCMV-DNALaktia der Mutter festgestellt werden. Da der Serostatus der Mutter unbekannt war, konnte der genaue Übertragungsweg nicht geklärt werden. Interessanterweise blieb das mit der selben Milch gefütterte Geschwisterchen uninfiziert. Daher müssen in diesem Fall auch andere – von der Muttermilch und der Mutter unabhängige Übertragungswege- wie insbesondere nosokomiale Infektionen vermutet werden. Zwar wurden dem Frühgeborenen nur HCMV-seronegative Blutprodukte verabreicht, wie weiter oben bereits besprochen, können jedoch auch HCMV-seronegative Blutprodukte HCMV enthalten. Auch eine Infektion über engen körperlichen Kontakt und infizierten Speichel anderer Familienangehöriger oder des medizinischen Personals können nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden.

Bei 9 der HCMV-infizierten Kinder wurde HCMV-DNA bereits innerhalb der ersten beiden Lebenswochen im Urin nachgewiesen. Der Definition nach handelt es sich hierbei nicht mehr um postnatale Infektion, sondern perinatale oder asymptomatische pränatale Infektionen (Ho et al., 1991). Alle Mütter dieser 9 Kindern waren DNALaktia positiv, also mit HCMV infiziert. Als weitere Infektionsquelle kommt neben Muttermilch der Kontakt mit kontaminierten Zervikalsekreten unter der Geburt in Frage. Allerdings wurden nur 3 dieser 9 Kinder vaginal entbunden, sodass eine Übertragung über infiziertes Zervikalsekret theoretisch möglich gewesen wäre. Bei allen 9 Kindern war die Urinprobe des ersten Lebenstages HCMV-negativ. Zusätzlich konnte von 5 dieser Kinder Plazentagewebe und Nabelschnurblut per PCR auf HCMV-DNA getestet werden. Alle Proben waren negativ. Eine asymptomatische intrauterine HCMV-

Infektion kann damit zwar nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden, erscheint aber unwahrscheinlich. Der genaue Übertragungsweg für diese 9 Kinder bleibt ungeklärt.

Zusammengefasst scheint Muttermilch in unserer Studie nicht die einzige, wohl aber die häufigste und wichtigste Quelle von HCMV bei der Übertragung auf das Neugeborene zu sein. Stillen kommt damit eine zentrale Bedeutung in der HCMV-Übertragung auf das Neugeborene zu. In einer prospektiven Studie untersuchte Stagno und Mitarbeiter (1980) 28 reifgeborene Kinder von Müttern mit Virolaktia. Stillen führte bei 11 von 19 (58 %) der Kinder zu einer HCMV-Infektion innerhalb der ersten 6 Lebensmonate, während sich keines der 9 (0 %) mit der Flasche ernährten Kinder infizierte. Dworsky und Mitarbeiter (Dworsky et al., 1983) zeigten, dass eine längere Stilldauer mit einer erhöhten Transmissionsinzidenz der 58 reifgeborenen Kinder korreliert. Im Bezug auf sehr kleine Frühgeborene konnte die Tübinger Studie hingegen zeigen, dass nicht die Dauer des Stillens, sondern die Höhe der Viruslast und das frühe Auftreten von HCMV in der Milch die entscheidenden Risikofaktoren für eine Virustransmission sind (Hamprecht et al., 2001; van der Strate et al., 2001). Ein direkter Beweis für die Virusübertragung durch Muttermilch ergab die genomische Analyse der Viren aus der Muttermilch und aus dem Urin des Kindes. Sie zeigten gleiche Virusvarianten bei Mutter und Kind (Hamprecht et al., 2001; Peckham et al., 1987; Prix et al., 1998).

Der genaue Infektionsweg, der zur Infektion durch infizierte Muttermilch führt, ist unklar. HCMV kann an eine Vielzahl von Zelltypen adsorbieren und diese infizieren. Als Rezeptor für die Virusadsorption wird der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF)-Rezeptor diskutiert (Wang et al., 2003). Zusätzlich könnte die Bindung des HCMV-Hüllproteins gB an Heparansulfat Proteoglykane beim Adsorptionsprozess eine CO-Rezeptorfunktion haben (Compton et al., 1993). Aufgrund eines noch ungeklärten Post-Penetrationsblocks ist eine produktive HCMV-Replikation jedoch nur in wenigen Zelltypen möglich, wie Fibroblasten, Epithelzellen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Hepatozyten, Granulozyten und Monozyten/Makrophagen (Kahl et al., 2000; Plachter et al., 1996; Sinzger et al., 1996). Kürzlich wurde gezeigt, dass HCMV auch Langerhans'sche Zellen der Mukosa infizieren kann (Hertel et al., 2003). Epidemiologische Daten und Befunde aus histopathologischen Präparaten sprechen für einen Viruseintritt über muköse Epithelzellen der Atemwege, des Gastrointestinal (GI)- oder Genitaltraktes (Sinzger et al., 1996). Neben Epithelzellen müssen bei der HCMV-Übertragung aber noch weitere Zelltypen als Eintrittspforten existieren. Anders wäre eine hämatogene Infektion (intrauterin oder nach Bluttransfusionen) nicht zu erklären. Für selbständig trinkende Kinder ist, wie beim Erwachsenen auch, eine Infektion über die Mund- und Rachenschleimhaut möglich. Die Frühgeborenen in unserer Studie wurden jedoch über eine Magensonde unter

Umgehung der Mund-, Rachen- und ösophagealen Schleimhaut mit Muttermilch ernährt. HCMV ist als behülltes Virus äußerst empfindlich gegenüber niedrigen pH-Werten und wird in der Regel während der Magenpassage inaktiviert. Bei Frühgeborenen ist im Unterschied zu Reifgeborenen der pH-Wert des Magens allerdings erhöht, sodass eine Übertragung über den GI-Trakt möglich wäre. Bei diesen Kindern könnte zellfreies HCMV die Magen-Passage überleben und über die Schleimhäute des tieferen GI-Traktes direkt in den Körper gelangen (van der Hoof et al., 1994).

Alternativ ist eine Infektion über infizierte Milchzellen denkbar. Milch-Makrophagen sind stark mit Lipiden beladen und hierdurch vor Säurezersetzung geschützt (Eglinton et al., 1994). HCMV könnte in produktiv infizierten Langerhans'schen Zellen die Magenpassage überleben und über Invasion in die resorbierende Schleimhaut des kindlichen GI-Traktes in den Organismus gelangen (Ogra et al., 1977; Xanthou et al., 1997).

Postnatale HCMV-Infektionen führen bei reifgeborenen Kindern äußerst selten zu symptomatischen Krankheitsverläufen (Vochem et al., 2003). Sehr kleine Frühgeborene befinden sich durch die Unreife ihres eigenen Immunsystems und des fehlenden Antikörperschutzes von der Mutter vor Ende der 28. Schwangerschaftswoche hingegen in einer Art immunkompromitierten Zustand. Sie sollten deutlich anfälliger für HCMV-Infektionen mit symptomatischen Verläufen sein. Wir konnten in unserer Studie bei 2 der 9 (22 %) postnatal infizierten Kinder ein sepsisartiges Krankheitsbild bzw. eine Hepatitis mit Cholestase-Ikterus beobachten, die beide unter Ganciclovir Therapie ausheilten und für die keine andere Ursache als die HCMV-Infektion gefunden werden konnte. In der Tübinger Studie wiesen vergleichsweise 4 von 33 (12 %) infizierten sehr kleinen Frühgeborenen schwere sepsisartige Krankheitsbilder mit Apnoe, Bradykardie und petechialen Blutungen auf (Maschmann et al., 2001). Detaillierte klinische Untersuchungen fanden sogar bei 6/18 Frühgeborenen (Yeager et al., 1983) und 16/33 sehr kleinen Frühgeborenen (Maschmann et al., 2001) zumindest ein Symptom (wie z.B. Neutropenie, Thrombozytopenie), das unspezifisch auch einer HCMV-Infektion zugeschrieben werden könnte. Die Studien aus Japan berichten hingegen in keinem einzigen Fall von symptomatischen Krankheitsverläufen peri- oder postnatal HCMV infizierter Frühgeborener (Asanuma et al., 1996; Mosca et al., 2001; Sharland et al., 2002; Yasuda et al., 2003). Einschränkend muss auch hier die prophylaktische Gabe von Immunglobulinen in Japan beachtet werden.

Bei genauerer Analyse der klinischen Parameter der von uns untersuchten Frühgeborenen wurde deutlich, dass HCMV-Infektionen den akuten Krankheitsverlauf von Frühgeborenen in der Neonatalperiode negativ beeinflussen. So zeigte sich bei HCMV-infizierten im Vergleich zu



uninfizierten Frühgeborenen eine erhöhte Inzidenz von „Bronchopulmonaler Dysplasie<sub>2</sub>“ (Prösch et al., 2002 b), „Respiratory Distress Syndrome“ (64 % vs. 45 %), Retinopathia praematurorum (32 % vs. 18 %) und Neonatalinfektion (50 % vs. 39 %). Dabei ist nicht klar, ob die erhöhten Inzidenzen von Bronchopulmonaler Dysplasie, Respiratory Distress Syndrome und Neonatalinfektion kausal mit der HCMV-Infektion zusammenhängen. Es ist aber davon auszugehen, dass sie einen zusätzlichen Risikofaktor für diese Erkrankungen darstellen, da bei allen Kindern das Virus in Tracheal-oder Pharyngealsekreten nachgewiesen werden konnte. Denkbar ist ebenso, dass der bereits eingeschränkte Gesundheitszustand der Frühgeborenen die HCMV-Infektion erst ermöglicht und nachfolgend den Krankheitsverlauf verschlechtert hat. Experimentelle Untersuchungen unterstützen die Hypothese, dass eine HCMV-Infektion bei Frühgeborenen einen negativen Einfluss auf die frühkindliche Lungenreifung hat. So supprimiert HCMV *in vitro* die Expression des Epidermalen Wachstumsfaktor Beta (EGF- $\beta$ ) -Rezeptors auf embryonalen Lungenfibroblasten (Beutler et al., 2003; Fairley et al., 2002). Durch Bindung von EGF an den EGF-Rezeptor auf Lungenfibroblasten wird eine Signaltransduktionskaskade in Gang gesetzt, die im Zusammenspiel mit Typ-II Alveolarzellen zur Reifung der Lunge und Entwicklung des Surfactantsystems beiträgt (Klein et al., 1995). EGF und der EGF-Rezeptor sind besonders für die Synthese von Surfactant Protein A verantwortlich- einem wichtigen Faktor der innate Immunabwehr-. EGF-Rezeptor defiziente Mäuse zeigten eine reduzierte Differenzierung des Alveolarepithels und eine inadäquate Ventilation der Alveolen (Miettinen et al., 1995; Miettinen et al., 1997).

EGF wird von Müttern Frühgeborener in besonders hohem Maße in die Milch ausgeschieden (Dvorak et al., 2003), womöglich als Kompensationsmechanismus, um die Lungenreifung ihrer unreifen Kinder zu beschleunigen. Über eine Blockierung des EGF-Signalweges und damit einhergehenden Hemmung der SP-A Produktion könnten HCMV-Infektionen eine verzögerte Lungenreifung in infizierten Frühgeborenen verursachen. Dies würde die Häufung respiratorischer Komplikationen (längere Beatmungszeit, Bronchopulmonale Dysplasie, Respiratory Distress Syndrome) der infizierten Kinder in unserer Studie erklären.

Neben einer negativen Beeinflussung des akuten Krankheitsverlaufes Frühgeborener durch HCMV-Infektion, wären insbesondere bei sepsisartigen Krankheitsbildern mit BPD und Lungenschädigung der Frühgeborenen auch Langzeitschäden zu erwarten. Fokussierend auf Entwicklungsstörungen und Hörbeeinträchtigungen zeigte das Flow-up der sehr kleinen Frühgeborenen aus der Tübinger Studie über 2- 4,5 Jahren zunächst keine Auffälligkeiten in der Gruppe der früh postnatal mit HCMV infizierten Kinder im Vergleich zu den nicht infizierten Frühgeborenen (Vochem et al., 2003; Vollmer et al., 2004).

Insgesamt ist davon auszugehen, dass es infolge peri/postnataler HCMV-Infektionen bei mindestens 10 % der infizierten sehr kleinen Frühgeborenen zu schweren symptomatischen Erkrankungen (in unserer Studie  $2/22 = 9\%$ ; Tübinger Studie  $4/33 = 12\%$ ) mit der Gefahr bleibender chronischer Schäden kommt. Vor diesem Hintergrund wurde in Deutschland die Diskussion entfacht, Muttermilch für frühgeborene Kinder zur Virusinaktivierung vorzubehandeln. Durch geeignete Inaktivierungsverfahren muss hierbei einerseits HCMV in der Milch effektiv und sicher inaktiviert werden, gleichzeitig aber sollen wichtige Inhaltsstoffe (immunologische Faktoren, Vitamine, Enzyme etc.) nicht zerstört werden. Während Einfrieren der Milch das Virus nicht effektiv genug inaktiviert (Bryant et al., 2002; Dworsky et al., 1982; Maschmann et al., 2001; Maschmann et al., 1999), führt Holder-Pasteurisierung ( $63^\circ/30\text{ min}$ ) neben effektiver Inaktivierung von HCMV auch zur Zerstörung von wichtigen Immunglobulinen und Lymphozyten (Dworsky et al., 1982; Goldblum et al., 1984). Lediglich Kurzzeitpasteurisierung ( $72^\circ\text{C}$ , 10 Sek.) scheint beide geforderten Kriterien zu vereinen und ist gegenwärtig in der Überführungsphase in die klinische Praxis. Allerdings sind die hierbei nötigen Geräte zur Zeit noch nicht kommerziell verfügbar (Hamprecht et al., 2001).

In einem kürzlich publizierten Konsensuspapier der Ernährungskommission der Österreichischen Gesellschaft für Kinder und Jugendheilkunde wurde vorgeschlagen, von allen Müttern Frühgeborener  $< 1500\text{ Gramm}$  oder  $< 32.\text{ SSW}$  den HCMV-Serostatus zu erheben. Ist die Mutter HCMV IgG-negativ könne die Muttermilch ohne Bedenken gefüttert werden, ist sie hingegen HCMV IgG-positiv soll das Kollostrum verworfen und die Muttermilch bis zur vollendeten 34. SSW einer Holderpasteurisation unterzogen werden (Zwiauer et al., 2003). In unserer Studie konnten wir im Fall einer seronegativen Mutter virale DNA in der Muttermilch nachweisen. Unter Berücksichtigung früherer Untersuchungen von Blutspendern ist anzunehmen, dass die Dunkelziffer HCMV-infizierten Mütter, bei denen es zu keiner Serokonversion gekommen ist, und Müttern, deren Serostatus mit den herkömmlichen ELISA falsch negativ bestimmt wurde, 5-10 % beträgt (s.o.). Der mütterliche Serostatus allein erscheint daher nicht auszureichend, gefährdete Kinder sicher zu identifizieren. Wir plädieren in Übereinstimmung mit Neonatologen der Charité (Prof. R.R. Wauer) daher dafür, die Milchproben aller Mütter (unabhängig vom Serostatus) von Kindern mit einem Geburtsgewicht unter 1500 Gramm und/oder unter der 32. SSW bis zur 6. Lebenswoche zu pasteurisieren. Dieser Zeitraum erscheint ausreichend, da der Gipfel der DNA-laktia und damit das höchste Infektionsrisiko um den 40. Tag nach der Geburt erreicht ist und danach stetig sinkt (Hamprecht et al., 2001). Einzig ausgenommen sollten Frühgeborene sein, die nicht über eine Magensonde oder Flasche ernährt werden müssen, sondern direkt an der Brust gestillt werden können. In diesen Fällen ist individuell zwischen dem

Risiko der HCMV-Infektion des Kindes und der besonderen emotionalen Bedeutung des Stillens für die Mutter-Kind-Beziehung abzuwägen. Um Risikofaktoren für das Auftreten symptomatischer postnataler HCMV-Infektionen genauer zu definieren und die ersten Leitlinien zur Muttermilchernährung gefährdeter Frühgeborener zu evaluieren und weiter zu entwickeln, sind weitere Studien unter Einbeziehung größerer Patientengruppen notwendig. Nur so können Frühgeborene vor schädigenden HCMV-Infektionen durch Muttermilch bewahrt werden, ohne ihnen jedoch in unnötigem Maße die Muttermilch mit ihren schützenden und stärkenden Einflüssen vorzuenthalten.

## 4.2 Einfluss von Muttermilch auf die Reaktivierung und Replikation von HCMV

Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre bringen die HCMV-Reaktivierung in Zusammenhang mit 3 grundlegenden Mechanismen (vgl. Kap. 1.6.):

- Inflammatorische Prozesse und Immunsuppression  
(Asadullah et al., 1999; Döcke et al., 1994; Fietze et al., 1994; Hummel et al., 2002)
- Zelldifferenzierungsprozesse insbesondere der myeloiden Zellreihe  
(Hahn et al., 1998; Sinclair et al., 1996; Sissons et al., 2002; Soderberg-Naucler et al., 2001; Taylor-Wiedeman et al., 1994)
- Stresssituationen  
(Archimandritis et al., 1992; Glaser et al., 1985; Prösch et al., 2000 a; Toro et al., 1996).

Die Mechanismen, die zu einer HCMV-Reaktivierung zu Beginn der Laktation führen sind bisher nicht untersucht. Die oben beschriebenen allgemeinen Mechanismen treffen jedoch auch für das Ende der Schwangerschaft zu. Insbesondere die Änderungen des mütterlichen Immunsystems während der Schwangerschaft, der mit Stress verbundene Geburtsvorgang sowie die tiefgreifenden hormonellen Umstellungen nach der Geburt wären als Ursache der HCMV-Reaktivierung in latent infizierten Zellen zu Beginn der Laktation denkbar. Die Population an T-Helferzellen ist bei Müttern am Ende der Schwangerschaft im Verhältnis zur Zahl der T-Suppressorzellen reduziert (Numazaki et al., 1997). Dies könnte die Aktivität der für die virale Abwehr wichtigen Natürlichen Killerzellen derart beeinflussen werden, dass es zu einer lokalen Virusreaktivierung in einem Milieu kommt, das weitere Vorteile für die HCMV-Replikation und -Reaktivierung bietet.

Die HCMV-Reaktivierung während der Laktation scheint ein lokal auf die Brust begrenzter Prozess zu sein. Bei lediglich 2 von 13 Müttern mit nachgewiesener DNAlaktia konnte in unserer Studie auch eine systemische HCMV DNAemia nachgewiesen werden (vgl. Kap. 3.1.2.). Eine dieser beiden war die einzige von 13 untersuchten Müttern, bei der neben einer DNAlaktia auch eine HCMV IgM-Serokonversion als Zeichen einer akuten systemischen Infektion infolge Reaktivierung beobachtet wurde. Auch in anderen Studien wurde bei nachgewiesener DNAlaktia und/oder Virolaktia keine IgM-Serokonversion der Mütter beobachtet (Asanuma et al., 1996; Hamprecht et al., 2001; Hotsubo et al., 1994). In älteren Untersuchungen hingegen wurde um den Geburtstermin herum infektiöses HCMV nicht nur aus Milch sondern auch aus 5,9 % (18/305) mütterlicher Urinproben und 13,4 % (35 / 261) Zervikalsekreten isoliert (Reynolds et al., 1973; Stagno et al., 1980). Unabhängig vom Vorhandensein von Virus in der Milch wurden

in einer Studie aus Brasilien HCMV-positive Zervikalsekrete bei 10 % (4 / 40) der schwangeren Frauen gefunden (Spano et al., 2004). Hamprecht (Hamprecht et al., 2001) konnte in Deutschland allerdings bei keiner von 73 Müttern mit DNA-laktia virale DNA in mütterlichen Rachenabstrichen oder Urinproben nachweisen. Damit sind die Anzeichen einer systemischen HCMV-Reaktivierung während der Schwangerschaft oder Laktation gering.

Bisher sind beim Menschen lediglich Vorläuferzellen der Monozyten/Makrophagen im Knochenmark als HCMV Trägerzellen und Ort der Latenz definitiv nachgewiesen (Hahn et al., 1998; Kondo et al., 1996; Mendelson et al., 1996). Daneben unterstützen auch reife Monozyten/Makrophagen, Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen eine HCMV-Replikation *in vivo* (Plachter et al., 1996). Folgt man der Hypothese einer lokalen Reaktivierung von HCMV in der Brust, so könnte das Virus einerseits über die aus dem mütterlichen Blutkreislauf ausgewanderten latent infizierten Monozyten/Makrophagen das Brustgewebe erreichen. Ein bestimmtes Milieu (virusstimulierende Substanzen, Schutz vor Immunabwehr o.ä.) könnte eine lokale HCMV-Reaktivierung und -Vermehrung in den eingewanderten Monozyten/Makrophagen begünstigen. Das Virus wird in der Milch häufiger zellfrei als zellassoziiert gefunden (Asanuma et al., 1996; Hamprecht et al., 1998 a; Hamprecht et al., 1998 b). Die Fraktion der Milchzellen zu Beginn der Laktation besteht aus 30-62 % Makrophagen, 35-60 % Granulozyten und 5-27 % Lymphozyten (Eglinton et al., 1994; Goldman et al., 2002). Der genaue Leukozytentyp, in dem das zellassoziierte Virus in der Milch auftritt, ist bisher nicht eindeutig identifiziert (Hamprecht et al., 2000).

Ein weiteres Virus, das in hohem Maße in die Milch ausgeschieden wird und dabei das gestillte Kind infizieren kann, ist das Humane Immunodeficiency Virus (HIV). In Untersuchungen zum Mechanismus der HIV-Migration in die Brustdrüsen, ist man auf eine Vielzahl intestinaler „homing marker“ auf HIV-infizierten Lymphozyten gestoßen. Eine zielgerichtete Wanderung von Lymphozyten, die das Virus von mukösen Zellen des GI-Traktes aufnehmen und über eine enteromammilläre Achse in die Brust verschleppen, wird diskutiert (Goldman et al., 2002; Kourtis et al., 2003). Auf diesem Wege könnten insbesondere Epithelzell-adaptierte HIV-Stämme des GI-Traktes -und in Analogie vielleicht auch HCMV-Stämme- die Brust erreichen. Die GI-Adaptation von HIV erleichterte *in vivo* die produktive HIV-Infektion von Brustepithelzellen (Toniolo et al., 1995). Dies könnte auch bei der Infektion des Kindes über Zellen des GI-Traktes eine begünstigende Rolle spielen. Allerdings findet man HIV- im großen Gegensatz zu HCMV- fast ausschließlich zellassoziiert und nicht als freies Virus in der Brustmilch.

Neben der Einwanderung latent infizierter Monozyten/Makrophagen-Vorläuferzellen in die Brust, wäre auch denkbar, dass Zellen der Brustdrüse (z.B. epitheliale Drüsenzellen) ein weiterer bisher unbekannter Latenzort von HCMV beim Menschen darstellen. Die sich ändernden Bedingungen im lokalen Milieu der Brust während der Laktation könnten zur Reaktivierung von latentem HCMV in epithelialen Drüsenzellen führen, in denen es daraufhin zur massiven Virusproduktion kommt.

Der Zeitpunkt des ersten HCMV-Nachweises in der Brustmilch weist darauf hin, dass die Virusreaktivierung in direktem Zusammenhang mit der Produktion von Milch steht. In Vormilch (Kollostrum), die in den ersten 3 Tage nach Entbindung gebildet wird, wurde keine HCMV-DNA nachgewiesen (Asanuma et al., 1996; Hotsubo et al., 1994; Mosca et al., 2001; Yasuda et al., 2003). In unserer Studie war virale DNA im Durchschnitt erstmalig in Milchproben des 7. Tages ( $\pm 2,6$ ) der Laktation detektierbar. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Beobachtungen von Yasuda (Yasuda et al., 2003) in der 2. Woche post partum und Hamprecht (Hamprecht et al., 2001) in der 3. Woche post partum. Die Viruslast in der Milch steigt zunächst drastisch an und erreicht im Mittel in der 3. bis 6. Woche der Laktation ihren Gipfel (ebenda). Quantitative PCR-Untersuchungen haben gezeigt, dass sich zu diesem Zeitpunkt  $10^4 - 10^6$  HCMV-DNA Kopien pro ml in der Milch befinden (van der Strate et al., 2001; Vochem et al., 1998; Yasuda et al., 2003). Danach sinkt die Viruslast kontinuierlich über einen langen Zeitraum ab, Virus ist aber auch nach mehreren Monaten noch nachweisbar (ebenda, eigene Untersuchungen). Die hohe Effektivität der HCMV-Reaktivierung während der Laktation (95 % HCMV-seropositiven Mütter scheiden Virus in der Muttermilch aus) erhebt die Frage, ob es in der Brustdrüse zur vermehrten Produktion von Substanzen kommt, die die Reaktivierung und Replikation von HCMV in den potentiellen Targetzellen (Monozyten/Makrophagen, Milchzellen) begünstigen bzw. stimulieren.

Aus der Literatur gibt es Hinweise, dass sich in der Muttermilch eine Vielzahl von Substanzen befinden, für die antivirale oder antimikrobielle Wirkung *in vitro* beschrieben wurde (Lönnerdal et al., 2003; Portelli et al., 1998). In Standard-Plaque-Tests führte die Vorinkubierung von HELF mit nativer Milch vor HCMV-Infektion in 2 von 3 Proben zu einer deutlichen Verringerung der HCMV-Infektion (Clarke et al., 2000). Analog bewirkten die in der Muttermilch nachgewiesenen Substanzen Laktoferrin, Monolaurin und Vitamin A eine Hemmung der Infektion von HELF mit HCMV-AD169 *in vitro* (Clarke et al., 2000; Harmsen et al., 1995; Isaacs et al., 2000; Portelli et al., 1998; Tanaka et al., 1984 a). Als Mechanismus für den antiviralen Effekt diskutieren die Autoren die Zerstörung der HCMV-Hülle durch antivirale Milchlipide (Clarke et al., 2000), die Virusneutralisierung durch spezifische IgA-

Immunglobuline (Alford et al., 1991) und die Blockierung von Heparansulfat- einem zellulären Ko-Rezeptor für HCMV (Harmsen et al., 1995; Wang et al., 2003). Der antivirale Effekt in diesen Experimenten war umso geringer, je kürzer die HELF-Kulturen mit Laktoferrin oder nativer Milch vorinkubiert wurden. Bei Zugabe von Laktoferrin zum Zeitpunkt der Infektion war die hemmende Wirkung gänzlich aufgehoben (Harmsen et al., 1995). Die beobachtete Schutzwirkung scheint damit auf der Hemmung der Virusadsorption durch milcheigene Stoffe zu beruhen. Die hohe Inzidenz von DNA-laktia und Virolaktia, sowie die beschriebenen Transmissionsraten auf gestillte Kinder (siehe oben) zeigen, dass diese Substanzen *in vivo* allerdings nicht in der Lage sind, HCMV in der Milch effizient zu inaktivieren und die Übertragung von HCMV zu verhindern. Entgegen den Erwartungen korrelieren hohe Laktoferrinkonzentrationen in der Milch nicht mit geringeren HCMV-Transmissionsraten auf das Neugeborene (van der Strate et al., 2001).

Andere *in vitro* Untersuchungen belegen, dass verschiedene milcheigene Stoffe die HCMV-Replikation sogar begünstigen könnten. So führte die Zugabe der in hoher Konzentration in der Muttermilch vorhandenen Stoffe wie Sialyl-Laktose, Glukokortikoiden oder Prostaglandin E2 und F2 $\alpha$  auf AD-169 infizierte HELF zu einer deutlich gesteigerten HCMV-Vermehrung (Clarke et al., 2000; Portelli et al., 1998; Tanaka et al., 1984 a; Tanaka et al., 1984 b). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der direkte Einfluss von zellfreier, fettreduzierter menschlicher Molke auf die HCMV-Replikation *in vitro* in HELF unabhängig vom Adsorptionsprozess untersucht. In diesen Infektionsexperimenten zeigte sich, dass Molke die HCMV-Replikation im Plaque-Test um das 1,7- bis 2,6-fache erhöht (vgl. 3.2.1.). Der replikationssteigernde Effekt von Molke korrelierte mit einer erhöhten Synthese der Immediate Early Proteine IE1 und IE2 (vgl. 3.2.2.). Gleiche Molkeproben ergaben vergleichbare Stimulierungsraten sowohl der Replikation des Virus als auch der IE1 und IE2 Protein-Synthese. Die HCMV Immediate Early Proteine IE1 und IE2 werden im Prozess der HCMV-Reaktivierung aus der Latenz sowie im produktiven Replikationszyklus als erste virale Proteine unabhängig von einer zellulären *de-novo* Proteinsynthese exprimiert (Ho M, 1991; Meier und Stinski, 1996). Sie regulieren die Transkription nachgeschalteter Early ( $\beta$ ) und Late ( $\gamma$ ) Gene, wobei erste vorwiegend viruspezifische Enzyme und letzte virale Strukturproteine kodieren (Mocarski et al., 2001). Zugleich besitzen IE1 und IE2 autoregulative Aktivität, indem sie die weitere Expression des gemeinsamen IE-Lokus positiv (IE1) oder negativ (IE2) beeinflussen (Cherrington et al., 1991; Fortunato et al., 1999; Malone et al., 1990). Durch Mutationsanalysen wurde gezeigt, dass die Expression der IE1 und IE2 Proteine essentiell für die Initiation und Aufrechterhaltung der

Virusreplikation ist (Chang et al., 1989; Gawn et al., 2002; Greaves et al., 1998; Marchini et al., 2001; Mocarski et al., 1996; Wathen et al., 1982).

Die Expression der IE1 und IE2 Proteine wird durch einen sehr starken IE-Enhancer/Promotor kontrolliert (Boshart et al., 1985). Distal des Enhancers liegt eine Modulatorregion (Abb. 3). Während die Deletion der Modulatorregion keine Auswirkung auf die virale Replikation in verschiedenen Zelltypen zeigte (Meier et al., 1997), ist der distale Enhancer absolut essentiell für die IE-Genexpression und bedingt die Effizienz der Virusreplikation (Isomura et al., 2003; Meier et al., 2000). Die Aktivität des IE1/2-Enhancer/Promotor wird bestimmt durch die an ihn bindenden Transkriptionsfaktoren (Meier et al., 1996). Dem IE1/2-Enhancer/Promotor kommt daher eine Schlüsselfunktion im produktiven Replikationszyklus und im Prozess der HCMV Reaktivierung zu.

In transienten Transfektionsexperimenten mit monozytären Zelllinien (einer der potentiellen Targetzellen für HCMV in der laktierenden Brust) konnten wir zeigen, dass Molkeproben von 10 verschiedenen Müttern frühgeborener Kinder die Aktivität des HCMV IE1/2-Enhancer/Promotors konzentrationsabhängig stimulieren. Dieser Effekt war in beiden getesteten monozytären Zelllinien, HL-60 und THP-1, identisch (siehe Kap. 3.3.1.) und damit unabhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen. Die absolute Höhe der Stimulation variierte jedoch zwischen Molkeproben verschiedener Mütter und änderte sich im Verlauf der Laktation. Molkeproben aus den ersten beiden Wochen nach der Geburt zeigten signifikant höhere Effekte auf die Aktivität des IE1/2-Enhancer/Promotors als Molkeproben der 3.-5. Woche nach Geburt. Der Peak der stimulierenden Wirkung von Molke auf den HCMV IE1/2-Enhancer/Promotor in der 1.-2. Woche geht somit dem Peak der Virusausscheidung in Muttermilch voran. Die höchste Viruslast in der Brustmilch wurde 3-6 Wochen nach Beginn der Laktation beobachtet (Van de Perre et al., 2003; Vochem et al., 1998; Yasuda et al., 2003). Da HCMV ein langsam replizierendes Virus ist, dessen Replikationszyklus bei optimalen Bedingungen 2-3 Tage braucht (Mocarski et al., 2001), ist die Verzögerung von 1-2 Wochen zwischen Peak der stimulierenden Aktivität und höchster Viruslast gut erklärbar. Untersuchungen an Transplantierten, Sepsis- und Myokardinfarktpatienten mit hoher Inzidenz von HCMV-Reaktivierungen haben ähnlich gezeigt, dass zwischen dem Peak des TNF $\alpha$ - oder Katecholaminspiegels im Blut und dem ersten Nachweis der HCMV-Antigenämie/DNAämie etwa 10 Tage liegen (Döcke et al., 1994; Fietze et al., 1994; Prösch et al., 2000 a). Die beobachtete Kinetik der molke-abhängigen Stimulierung der IE1/2-Enhancer/Promotoraktivität könnte mit der Zusammensetzung der Milch zusammenhängen, die sich insbesondere innerhalb der ersten Wochen der Laktation verändert. Frühe Milch enthält höhere Anteile an Proteinen, Oligosacchariden und Milchzellen, im



Vergleich zu später Milch, in der höhere Laktose- und Fettanteile gemessen werden (Kunz et al., 1999; Lönnerdal et al., 2003).

**Tab. 6: Inhaltsstoffe humaner Muttermilch**

(Gupta et al., 1983; Kunz et al., 1999; Lönnerdal et al., 2003; Rodriguez-Palmero et al., 1999; Wallace et al., 1997)

| <b>Hormone</b>   | <b>Immunmodulatoren</b>  |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Prolaktin</li> <li>• Glukokortikoide</li> <li>• Progesteron</li> <li>• Östrogen</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sekretorisches IgA</li> <li>• Oligosaccharide</li> <li>• Fettsäuren</li> <li>• Interleukine: IL1-<math>\beta</math>; IL-6,</li> <li>• IL-8, IL-10, TNF<math>\alpha</math>, TGF-<math>\alpha</math>, <math>\beta</math></li> <li>• Vitamine A, E, D, K</li> <li>• Prostaglandine E2, F2<math>\alpha</math></li> <li>• Laktoferrin</li> <li>• RANTES</li> <li>• Prostaglandine E2, F2<math>\alpha</math></li> </ul> |
| <b>Wachstumsfaktoren</b>   | <b>Enzyme</b>  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Epidermal Growth Factor-<math>\beta</math> (EGF-<math>\beta</math>)</li> <li>• Gonadotropin – Releasing Hormon (Gn-RH)</li> <li>• Insulin-like growth factor (IGF-1)</li> <li>• Erythropoietin (EPO)</li> <li>• Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\alpha</math>1-Antitrypsin</li> <li>• Lipasen</li> <li>• Lysozyme</li> <li>• Bile salt-stimulated lipase</li> <li>• Amylase</li> </ul>  |
| <b>Proteine</b>  |  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Caseine <math>\beta</math>, <math>\kappa</math></li> <li>• <math>\alpha</math>-Lactalbumin</li> <li>• Serum- Albumin</li> </ul>   |  |

Dabei enthält Muttermilch neben den für die Ernährung des Kindes notwendigen Substanzen über 45 bioaktive Faktoren, darunter Enzyme, Hormone, Wachstumsfaktoren und Zytokine, die Einfluss auf die von uns beobachteten Effekte nehmen könnten. In Tabelle 6 sind nur einige dieser bereits bekannten Inhaltsstoffe aufgezeigt, während die Liste neu entdeckter Substanzen stetig wächst (Bianco et al., 2001; Michalsky et al., 2002; Michie et al., 1998; Takahata et al., 2001).

Aus klinischen und experimentellen Untersuchungen in unserer Arbeitsgemeinschaft ist bekannt, dass systemische Entzündungen (insbesondere TNF $\alpha$ ) und Stress (vermittelt über Katecholamine und Glukokortikoide) eine Reaktivierung von HCMV auslösen können (Archimandritis et al., 1992; Fietze et al., 1994; Glaser et al., 1985; Prösch et al., 2002 b; Prösch et al., eingereicht). Hierbei binden bestimmte Transkriptionsfaktoren (NF $\kappa$ B für TNF $\alpha$ , CREB/ATF für

Katecholamine) bzw. der intrazelluläre Glukokortikoidrezeptor (GR) direkt an repetitive Elemente im HCMV IE1/2-Enhancer/Promotor und erhöhen seine Aktivität (siehe Kap. 1.4.2).

Glukokortikoide sind besonders in der frühen Phase der Laktation in der Muttermilch erhöht (Kulski et al., 1981; Patacchioli et al., 1992). TNF $\alpha$  aber auch der lösliche TNF $\alpha$ -Rezeptor wurden in unterschiedlichem Maße in der Muttermilch nachgewiesen (Buescher et al., 2001). Durch den mit der Geburt einhergehenden Stress könnten auch Katecholamine vermehrt in die Muttermilch ausgeschieden werden.

Mithilfe von Promotormutanten, die entweder nicht mehr den GR (p17mut3), NF $\kappa$ B (p18mut4) oder CREB/ATF (p19mut5) binden können, prüften wir, ob diese Transkriptionsfaktoren in die stimulierenden Effekte von Molke auf den HCMV IE1/2-Enhancer/Promotor involviert sind um dann Rückschlüsse auf die Mediatoren der HCMV (Re-)aktivierung während der Laktation ziehen zu können.

Bei 4 von 6 getesteten Molkeproben verschiedener Mütter konnte in unseren Versuchen gezeigt werden, dass die Deletion der GREs (p17mut3) den stimulierenden Einfluss der Molke auf die Aktivität des IE 1/2- Enhancer/Promotors deutlich verringert (vgl. 3.4.1.). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Glukokortikoide in der Muttermilch eine der Substanzen sein könnten, welche die Stimulation des HCMV IE1/2-Enhancer/Promotor verursachen. Diese Hypothese wurde gestützt durch Experimente, in denen durch Zugabe des Antiglukokortikoids RU-486 zu pRR55-transfizierten HL-60 Zellen die stimulierende Wirkung von Molke ebenfalls gesenkt werden konnte (vgl. 3.4.2.). Allerdings war die Reduktion des stimulierenden Effektes von Molke auf die Aktivität des HCMV IE1/2-Enhancer/Promotor in beiden Versuchsansätzen inkomplett, sodass davon auszugehen ist, dass Glukokortikoide nur ein Faktor in einem multifaktoriellen Prozess der Promotorstimulation durch Molke sind.

Die drei im IE1/2-Enhancer/Promotor enthaltenen 17 bp Sequenzmotive wurden als Bindungsort für den Transkriptionsfaktor „Nuklear Faktor-1“ (NF-1) beschrieben (Niller et al., 1991). Kürzlich identifizierten unsere Arbeitsgemeinschaft innerhalb dieser 17 bp Sequenz ein „glucocorticoid responsive element“ (GRE) (Prösch et al., 2001). Mittels EMSA wurde eine Bindung des Glukokortikoidrezeptors (GR) an diese GRE bestätigt und gezeigt, dass NF-1 und der GR gleichzeitig am 17 bp Motiv des IE1/2-Enhancer/Promotors binden können. Natürliche und synthetische Glukokortikoide (z.B. Kortisol, Dexamethason) binden an den durch die Hitzeschockproteine hsp90 und hsp56 inaktivierten intrazellulären Glukokortikoidrezeptor und bewirken dessen Aktivierung (Pratt et al., 1993; Smith et al., 1993). Dissoziation der Hitzeschockproteine und Hyperphosphorylierung führen zu Konformationsänderung und schneller Translokation des Rezeptorkomplexes in den Zellkern (Orti et al., 1989; Picard et al.,

1987). Hier binden GR-Homodimere an spezifischen GREs in der Promotorregion, wodurch die Transkription Gene positiv (z.B. Surfactant Protein A, Haptoglobin, Leptin, Glukose 6-Phosphatase, Glutaminase) oder negativ (Interleukine 1-4, 6, 8, 10, 12, IFN $\gamma$ , ICAM-1) beeinflusst wird (McKay et al., 1999). In HL-60 Zellen wurde eine Stimulierung der HCMV IE1/2-Enhancer/Promotoraktivität durch Dexamethason gezeigt (Prösch et al., 1992). Dieser Effekt war spezifisch auf die Wirkung der Glukokortikoide zurückzuführen: wurden die GRE-Konsensussequenz so mutiert, dass im EMSA keine Bindung des GR mehr beobachtet werden konnte, war auch die Stimulierbarkeit dieser IE-Promotormutante durch Glukokortikoide aufgehoben (ebenda). Mit der transaktivierenden Wirkung von Glukokortikoidrezeptoren auf den IE1/2-Enhancer/Promotor wurde erstmals ein Mechanismus beschrieben, der die schon lange bekannte Steigerung der HCMV-Replikation durch Glukokortikoide *in vitro* in HELF, Vorhautfibroblasten und Makrophagen auf molekularer Ebene erklärt (Lathey et al., 1991; Leonardi et al., 1992; St George et al., 1994; Tanaka et al., 1984 a; Tanaka et al., 1984 b).

Glukokortikoide (Z.B. Kortison, Kortisol, Dexamethason) sind Steroidhormone, die in der Zona fasciculata der Nebenniere gebildet werden. Sie sind wichtige Gegenspieler des Insulins bei der Regulation des Plasmaglukosespiegels und greifen in Prozesse des Eiweiß- und Fettstoffwechsels ein (Löffler et al., 2003). Ihnen kommt eine starke antiphlogistische Wirkung zu, indem sie die Genexpression inflammatorischer Zytokine herunterregulieren und die Proliferation von Lymphozyten hemmen (McKay et al., 1999). *In vivo* Untersuchungen an Mäusen und Ratten zeigten, dass Glukokortikoide essentiell für die Reifung der Brustdrüsen sowie den Prozess der Laktogenese sind (Nguyen et al., 2001). Sie induzieren den Schluss von tight junctions zwischen den alveolären Brustepithelzellen und ermöglichen damit die gezielte Ansammlung von Milch im Lumen (ebenda). Synergistisch mit Prolaktin (Dogusan et al., 2001) stimulieren Glukokortikoide die Genexpression des wichtigsten Milchproteins  $\beta$ -Kasein (Doppler et al., 1989; Stöcklin et al., 1997). Interessanterweise verläuft dieser Prozess allerdings unabhängig von einer direkten DNA-Bindung des GR über Protein-Protein Interaktion mit dem „signal transducer and activator of transcription 5“ (STAT 5) (Doppler et al., 1989; Stöcklin et al., 1997). Der Gehalt an Glukokortikoiden in der Muttermilch schwankt in Molkeproben verschiedener Mütter und liegt zwischen 17 bis 136 ng/ml (Alexandrova et al., 1983; Patacchioli et al., 1992). Damit beträgt er in etwa 5 - 25 % des mütterlichen Plasmakortisolgehalts (Ost et al., 1985). Ein besonders hoher Kortisolgehalt wird in Kollostrum und früher Milch gemessen, während er bei fortschreitender Laktation deutlich sinkt (Kulski et al., 1981; Patacchioli et al., 1992). Da wir in unseren Untersuchungen beobachteten, dass die Molke in den ersten beiden Wochen der Laktation den IE1/2-Enhancer/Promotoraktivität von HCMV besonders deutlich

stimuliert (vgl. 3.3.2.), korreliert dies mit den in der Literatur beschriebenen höheren Kortisolkonzentrationen in früher Milch.

Die Deletion der NF $\kappa$ B-Bindungsstellen hatte im Gegensatz zu den GREs keine Auswirkung auf die molke-abhängige Stimulation der HCMV IE1/2-Enhancer/Promotoraktivität in monozytären Zellen. TNF $\alpha$  als potenter Entzündungsmediator scheint daher in diesem Prozess keine oder nur eine sehr untergeordnete Rolle zu spielen. Lediglich eine Molkeprobe zeigte in mit p18mut4 transfizierten Zellen im Vergleich zu mit pRR55 transfizierten Zellen einen deutlich reduzierten Effekt auf die CAT-Expression. In dieser Molkeprobe könnte TNF $\alpha$  zur Stimulation des IE1/2-Enhancer/Promotors und viralen Replikation beigetragen haben (Prösch S, pers. Mitteilung). Der in der Literatur beschriebene TNF $\alpha$ -Gehalt von Milchproben der ersten Monate zeigt mit 0-2933 pg/ml sowohl enorme individuelle Unterschiede als auch weite Diskrepanzen zwischen verschiedenen Studien (Buescher et al., 2001; Hawkes et al., 1999; Laiho et al., 2003; Rudloff et al., 1992). Etwa 3-20 % stillender Mütter entwickeln in den ersten 3 Monaten der Laktation eine akute Mastitis (Kaufmann et al., 1991). Milchproben, die während einer akuten Mastitis gewonnen wurden, wiesen signifikant erhöhte TNF $\alpha$ -Konzentrationen auf (Buescher et al., 2001), und *in vitro* isolierte Milchmonozyten reagierten mit einer 2-100-fach erhöhten Produktion von IL-6 und TNF $\alpha$ , wenn sie durch Infektion mit dem RS-Virus stimuliert wurden (Sone et al., 1997). Über HIV ist bekannt, dass Mastitis die Viruslast in der Brustmilch erhöht und zu signifikant erhöhten Transmissionsraten auf die gestillten Säuglinge führt (Semba et al., 1999; Willumsen et al., 2003). Entzündungen der Brust – auch getriggert durch eine HCMV-Infektion der Brust per se - wurden daher auch als wichtiger Stimulus der HCMV Virusreplikation in der Brust/Milch diskutiert. Neben TNF $\alpha$  enthält Kollostrum und Milch auch bedeutende Mengen ( $4507 \pm 770$  pg/ml) an löslichem TNF $\alpha$ -II Rezeptor (Büscher et al., 1996; Hawkes; Bryan et al., 1999; Laiho et al., 2003; Liu et al., 1992; Rudloff et al., 1992)b. Der Großteil des in Milch enthaltenen TNF $\alpha$  liegt daher wahrscheinlich in gebundener und somit inaktivierter Form vor (Baldanti et al., 1998; Büscher et al., 1996; Büscher et al., 1998; Rudloff et al., 1992). Neutralisierung der TNF $\alpha$  Aktivität in der Milch könnte ein Grund für die nach unseren Daten untergeordnete Rolle von TNF $\alpha$  in der Muttermilch sein. Ob es allerdings bei Frauen mit akuter Mastitis zu erhöhten HCMV- Re(aktivierungen) in der Brust kommt, ist unklar und müsste in einer Studie geklärt werden. Die von uns verwendete Muttermilch stammte ausschließlich von Müttern ohne Zeichen einer Mastitis.

Die in Stresssituationen vermehrt gebildeten Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin (Lodish et al., 1995; Löffler et al., 2003) sowie Prostaglandin E2 führten in *in vitro*

Transfektionsexperimenten zu einer Aktivierung des IE1/2-Enhancer/Promotors in THP-1 und HL-60 Zellen (Kline et al., 1998; Prösch et al., 2000 b). Die Promotorstimulation durch Katecholamine und Prostaglandin E2 erfolgt dabei über Erhöhung des intrazellulären cAMP Gehalts, wodurch die Transkriptionsfaktoren der CREB/ATF-Familie aktiviert werden. CREB-1/ATF-1 binden an die „cAMP responsive elements“ (CRE) in den 19 bp Motiven im IE1/2-Enhancer/Promotor (Fickenscher et al., 1989; Hunninghake et al., 1989; Meier et al., 1996; Stamminger et al., 1990) und führen zu einer Steigerung der IE1/2-Promotoraktivität (Keller et al., 2003; Prösch et al., 2000 b). Prostaglandin E2 wird in den ersten drei Monaten der Laktation mit steigender aber sehr heterogener Konzentration ( $<10-9966$  pg/ml) in die Brustmilch ausgeschieden (Hawkes et al., 1999), die Konzentrationen von Adrenalin und Noradrenalin in der Milch sind nicht bekannt. Nach den Ergebnissen der Transfektionsexperimenten mit p19mut5 spielen Katecholaminen und Prostaglandinen keine signifikante Rolle im Prozess der Molke-induzierte IE1/2-Enhancer/Promotorstimulation. Einschränkend ist allerdings zu bedenken, dass natürliche Katecholamine nur eine kurze Halbwertszeit von 30-120 Sekunden haben (Löffler et al., 2003) und ihr Einfluss in unserem Transfektionssystem daher nur schwer zu erfassen ist.

Zwei weitere Substanzen, die an der Molke-abhängigen Stimulierung des HCMV IE1/2-Enhancer/Promotor beteiligt sein könnten, sind Prolaktin und der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF). In Milchproben der ersten Woche werden deutlich höhere Prolaktinkonzentrationen ( $43,1 \pm 4$  ng/ml) als in Milchproben nach einem Monat ( $11 \pm 1,4$  ng/ml) gemessen (Cox et al., 1996; Yuen et al., 1988). Prolaktin übt Zytokine-ähnliche Wirkung auf PBMCs und Granulozyten aus, in denen es über Aktivierung von STAT5 die Expression immunmodulatorischer Gene wie dem „interferon regulatory factor-1“-Gen (IRF-1) und verschiedene „suppressor of cytokine signaling“ Genen (SOCS) moduliert (Dogusan et al., 2001). Auch EGF wird besonders am Beginn der Laktation in hohen Mengen ( $0,8-1,8$  µl/ml) in die Milch sekretiert (Lönnerdal et al., 2003; Read et al., 1984; Saito et al., 1994). Dabei weisen Milchproben von Müttern sehr kleiner frühgeborener Kinder (23.-27. GW) signifikant höhere EGF-Konzentration auf als die reif geborener Kinder (32.-36. bzw. 38.-42. GW) (Dvorak et al., 2003). Da diese Charakteristika durchaus mit der von uns beobachteten Kinetik der IE1/2-Enhancer/Promotorstimulation durch Molke vereinbar waren, wurde der Einfluss von EGF und Prolaktin auf die IE1/2-Enhancer/Promotoraktivität in pRR55-transfizierten HL-60 Zellen geprüft. Hierbei zeigten jedoch weder Prolaktin noch EGF einen Einfluss auf die Aktivität des HCMV IE1/2-Enhancer/Promotors (vgl. 3.4.3.), obwohl Prolaktinrezeptoren (Dardenne et al., 1994; Nishiguchi et al., 1993) und EGF-Rezeptoren (Eales-Reynolds et al., 2001; Taetle et al.,

1991) auf HL-60 Zellen beschrieben wurden. Einschränkend muss allerdings angeführt werden, dass im Rahmen dieser Arbeit nicht abgeklärt werden konnte, ob die von uns verwendeten HL-60 Zellen tatsächlich Rezeptoren für Prolaktin und EGF auf ihrer Oberfläche exprimieren. Da viele Substanzen ihre Aktivität erst in Kombination mit anderen Substanzen entfalten (z.B. Prolaktin/Kortisol), müssten in folgenden Experimenten auch Kombinationen von Substanzen getestet werden.

Zusammenfassend konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation gezeigt werden, dass zellfreie Molke die Replikation von HCMV über Erhöhung der Aktivierung des IE1/2-Enhancer/Promotors und der IE1- und IE2-Proteinsynthese erhöhen kann. Der Effekt ist multifaktoriell. Ein Faktor konnte identifiziert werden– Glukokortikoide. Die Natur der anderen Komponenten bleibt unbekannt.  $\text{TNF}\alpha$ , Katecholamine und Prostaglandin E konnten weitgehend ausgeschlossen werden. Die Rolle von Prolaktin und EGF muss weiter untersucht werden, ebenso wie der Einfluss des strukturellen EGF Homologs „Transforming Growth Faktor- $\beta$ “ (TGF- $\beta$ ) und Laktoferrin. Beide Substanzen wurden in Muttermilch nachgewiesen (Lønnerdal et al., 2003; Saito et al., 1994). Kürzlich wurde gezeigt, dass Laktoferrin und TGF- $\beta$  die Replikation des Humanen T-Zell Leukämie Virus Typ 1 (HTLV-1) in infizierten PBMCs steigern (Moriuchi et al., 2001; Moriuchi et al., 2002). Basis der stimulierenden Aktivität von TGF- $\beta$  auf die HTLV-1 Replikation ist die Erhöhung der Long-terminal repeat (LTR)-Promotoraktivität des Virus. In der gleichen Publikation wurde darauf hingewiesen, dass der HCMV IE1/2-Enhancer/Promotor in PBMCs HTLV-1 infizierter Patienten durch TGF- $\beta$  'geringfügig erhöht' wird. In einer Studie schien eine hohe Laktoferrinkonzentration mit hoher HCMV Viruslast in der Milch zu korrelieren (van der Strate et al., 2001). Auch für Laktoferrin wurde eine transaktivierende Aktivität nachgewiesen, die es über direkte DNA-Bindung an eine „Laktoferrin bindende Konsensus Sequenz“ (LBS) ausübt (He et al., 1995). Über diese LBS steigert Laktoferrin die IL-1 $\beta$  Expression in humanen myeloischen Leukämiezellen (K562) (Son et al., 2002). Eine transaktivierende Wirkung von TGF $\beta$  und Laktoferrin auf den HCMV IE1/2-Enhancer/Promotor wäre daher denkbar und sollte geprüft werden.

## 5 Zusammenfassung

Die intrauterine Übertragung des Humanen Cytomegalievirus (HCMV) stellt die häufigste kongenitale Virusinfektion in Europa dar, die mit teils schwerwiegenden Embryopathien und Langzeitschäden des Kindes einhergeht (Pass et al., 2001). Darüber hinaus wurde in den letzten Jahren deutlich, dass postnatale HCMV-Infektionen insbesondere für sehr kleine Frühgeborene ein hohes Gesundheitsrisiko darstellen und zu schweren symptomatischen Krankheitsverläufen führen können (Vochem et al., 2003). Die wichtigste Virusquelle für postnatale Infektionen ist virushaltige Muttermilch (Hamprecht et al., 2001). Im Rahmen einer prospektiven Studie wurde in der vorliegenden Arbeit die Inzidenz der HCMV(Re-)aktivierung in stillenden Müttern und der Übertragung des Virus auf Frühgeborene (<32. SSW od. <1500 g) in der Klinik für Neonatologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte untersucht.

Im Kollektiv der 73 stillenden Mütter und ihrer 89 frühgeborenen Kinder (<32. SSW oder <1500 gr.) wurde bei 48 (66 %) Müttern eine HCMV-Reaktivierung in der laktierenden Brust innerhalb der ersten Wochen nach Geburt festgestellt. Für HCMV-IgG seropositive Mütter lag die Reaktivierungsrate bei 95 % (18/19). Erstmals wurde auch in einer von 8 HCMV-seronegativen Müttern HCMV-DNA in der Brustmilch nachgewiesen. Dieser Befund bestätigt, dass 5-10 % der seronegativen Probanden latent mit HCMV infiziert sind (Larsson et al., 1984, Döcke et al., 1994; Rahbar et al., 2004).

Als Folge der Reaktivierung von HCMV übertrugen 42 % (20/48) der HCMV-DNA-laktia positiven Mütter das Virus peri/postnatal auf ihre frühgeborenen Kinder. Die kumulative Transmissionsrate bezogen auf die exponierten Frühgeborenen betrug 38 % (21/55). Bei 11 der 21 infizierten Kindern konnte eine postnatale Virusübertragung bestätigt werden. Alle diese Kinder wurden mit HCMV-positiver Muttermilch ernährt, sodass Brustmilch als Infektionsquelle wahrscheinlich ist. Ein weiteres infiziertes Kind wurde nachweislich mit HCMV-freier Muttermilch gefüttert, sodass eine nosokomiale Infektion angenommen werden muss. Bei 9 Frühgeborenen wurde bereits innerhalb der zweiten Lebenswoche erstmalig Virus im Urin nachgewiesen. Hier handelte es sich um perinatale HCMV-Übertragungen, bei denen neben virushaltiger Muttermilch auch andere Infektionsquellen in Frage kommen. Bei 2 der 13 postnatal infizierten Frühgeborenen wurden typische HCMV-assoziierte Symptome beobachtet. Ein Kind entwickelte eine fulminante (HAV-, HBV-, HCV-negative) Hepatitis mit Cholestase-Ikterus, das andere ein schweres sepsisartiges Krankheitsbild. Auch wurden deutlich höhere Inzidenzen von Atemwegserkrankungen ('respiratory distress syndrome' und

Bronchopulmonaler Dysplasie) in der Gruppe der HCMV-infizierten Frühgeborenen im Vergleich zur nichtinfizierten Gruppe beobachtet.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen epidemiologischen Daten sind sehr ähnlich denen einer vergleichbaren Studie in Tübingen (Hamprecht et al., 2001). Im Ergebnis beider Studien ist davon auszugehen, dass in Deutschland mindestens 10 % der Frühgeborenen eine symptomatische postnatale HCMV-Erkrankung durch infizierte Muttermilch entwickeln. Um dieses Infektionsrisiko für sehr kleine Frühgeborene (<1500 gr. oder <32. SSW) zu minimieren, schlagen wir vor, die Brustmilch vor Verfütterung zu pasteurisieren.

Die Reaktivierung von HCMV in stillenden Müttern scheint im wesentlichen ein lokal auf die laktierende Brust begrenzter Prozess zu sein. Nur bei 2 von 13 getesteten Müttern mit HCMV DNA-laktia konnte eine systemische Infektion nachgewiesen werden, und nur bei einer der beiden Mütter kam es während der Virusausscheidung zu einer HCMV-Serokonversion. Als Beitrag zur Aufklärung des Mechanismus der HCMV (Re-)aktivierung wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit die Hypothese überprüft, ob es in der Brust/Muttermilch physiologischerweise Substanzen gibt, welche die Replikation von HCMV triggern. In in vitro Infektionsversuchen konnte erstmalig gezeigt werden, dass zellfreie Molke die HCMV-Replikation in HELF steigert und die Synthese der sehr frühen Proteine IE1 und IE2 erhöht, denen eine Schlüsselfunktion im HCMV-Reaktivierungsprozess zukommt. In monozytären Zellen (einer potentiellen Targetzelle von HCMV in der Brust) bewirkte zellfreie Molke eine statistisch signifikante Erhöhung der Aktivität des HCMV IE1/2-Enhancer/Promotors, der die Synthese der IE-Proteine reguliert. Molkeproben, die während der ersten beiden Wochen der Laktation gesammelt wurden, verursachten deutlich höhere Promotorstimulationen als Molkeproben, die zu einem späteren Zeitpunkt während der Laktation gesammelt wurden. Diese Kinetik war identisch für Brustmilch von HCMV-seronegativen und -seropositiven Müttern, sodass davon auszugehen ist, dass die verantwortlichen Substanzen virusunabhängig, physiologischerweise in der Muttermilch vorhanden sind. Der Peak der höchsten HCMV-stimulierenden Aktivität liegt ca. 1-2 Wochen vor dem Peak der höchsten Viruslast in der Muttermilch (3.-6. Woche post partum).

Durch Untersuchungen an HCMV IE1/2-Enhancer/Promotormutanten, die bestimmte Transkriptionsfaktoren nicht mehr binden, konnte gezeigt werden, dass die Molke-abhängige Stimulierung der Promotoraktivität ein multifaktorieller Prozess ist und Glukokortikoide in diesem Prozess eine zentrale Rolle spielen. Die Tatsache, dass die Konzentration von Glukokortikoiden in früher Brustmilch deutlich höher sind, als in späteren Milchproben



(Patacchioli et al., 1992) unterstützt einen kausalen Zusammenhang zwischen Glukokortikoiden in der Milch und der von uns beobachteten Kinetik der HCMV IE1/2-Enhancer/Promoterstimulation durch Molke.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adam, E.; Melnick, J. L.; Probstfield, J. L.; Petrie, B. L.; Burek, J.; Bailey, K. R.; McCollum, C. H. und DeBakey, M. E. (1987): High levels of cytomegalovirus antibody in patients requiring vascular surgery for atherosclerosis, *Lancet* (Band 2), Nr. 8554, Seite 291-3.
- Adler, S. P.; Baggett, J. und McVoy, M. (1985): Transfusion-associated cytomegalovirus infections in seropositive cardiac surgery patients, *Lancet* (Band 2), Nr. 8458, Seite 743-7.
- Ahlfors K., Ivarsson SA. (1985): Cytomegalovirus in breast milk of Swedish milk donors, *Scand J Infect Dis* (Band 17), Seite 11-13.
- Ahlfors K., Ivarsson SA., Harris S. (1999): Report on a long-term study of maternal and congenital cytomegalovirus infection in Sweden. Review of prospective studies available in literature, *Scand J Infect Dis* (Band 31), Seite 443-457.
- Alexandrova, M. und Macho, L. (1983): Glucocorticoids in human, cow and rat milk, *Endocrinol Exp* (Band 17), Nr. 3-4, Seite 183-9.
- Alford, C. (1991): Breast milk transmission of cytomegalovirus (CMV) infection, *Adv Exp Med Biol* (Band 310), Seite 293-9.
- Anderson KS., Amos CS. Boppana S., Pass R (1996): Ocular abnormalities in congenital cytomegalovirus infection, *J. Am. Optom. Assoc.* (Band 67), Seite 273-8.
- Archimandritis, A.; Markoulatos, P.; Tjivras, M.; Alexiou, A.; Kordossi, A.; Kordossis, T. und Fertakis, A. (1992): Herpes simplex virus types 1 and 2 and cytomegalovirus in peptic ulcer disease and non-ulcer dyspepsia, *Hepatogastroenterology* (Band 39), Nr. 6, Seite 540-1.
- Asadullah, K.; Prosch, S.; Audring, H.; Buttnerova, I.; Volk, H. D.; Sterry, W. und Docke, W. D. (1999): A high prevalence of cytomegalovirus antigenaemia in patients with moderate to severe chronic plaque psoriasis: an association with systemic tumour necrosis factor alpha overexpression, *Br J Dermatol* (Band 141), Nr. 1, Seite 94-102.
- Asanuma H., Numazaki K., Nagata N., Hotsubo T., Horino K., Chiba S. (1996): Role of milk whey in the transmission of human cytomegalovirus infection by breast milk, *Microbiol Immunol* (Band 40), Seite 201-4.
- Baldanti F., Sarasini A., Furione M., Gatti M., Comolli G., Revello MG., Gerna G. (1998): Coinfection of the immunocompromised but not the immunocompetent host by multiple human cytomegalovirus, *Arch of Virology* (Band 143), Seite 1701-1709.
- Bauer H., Ting Y., Greer C., Chambers J., Cathy MD. et al. (1991): Genital Human Papillomavirus Infection in Female University Students as determined by a PCR-based Method, *JAMA* (Band 265), Nr. 4, Seite 472-76.
- Beutler T., Hoflich C., Stevens PA., Kruger DH., Prosch S. (2003): Downregulation of the epidermal growth factor receptor by human cytomegalovirus infection in human fetal lung fibroblasts, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 28), Nr. 1, Seite 86-94.
- Bianco, C.; Wechselberger, C.; Ebert, A.; Khan, N. I.; Sun, Y. und Salomon, D. S. (2001): Identification of Cripto-1 in human milk, *Breast Cancer Res Treat* (Band 66), Nr. 1, Seite 1-7.
- Boppana, S. B.; Pass, R. F.; Britt, W. J.; Stagno, S. und Alford, C. A. (1992): Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality, *Pediatr Infect Dis J* (Band 11), Nr. 2, Seite 93-9.
- Boshart, M.; Weber, F.; Jahn, G.; Dorsch-Hasler, K.; Fleckenstein, B. und Schaffner, W. (1985): A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus, *Cell* (Band 41), Nr. 2, Seite 521-30.

- Bradford MM. (1976): A rapid and sensitive Method for the quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye-Binding, *Anal Biochem* (Band 72), Seite 248-54.
- Bryant P., Morley C., Garland S., Curtis N. (2002): Cytomegalovirus transmission from breast milk in premature babies: does it matter?, *Arch Dis Child* (Band 87), Seite F75-77.
- Buescher, E. S. und Hair, P. S. (2001): Human milk anti-inflammatory component contents during acute mastitis, *Cell Immunol* (Band 210), Nr. 2, Seite 87-95.
- Büscher, E. S. und Malinowska, I. (1996): Soluble receptors and cytokine antagonists in human milk, *Pediatr Res* (Band 40), Nr. 6, Seite 839-44.
- Büscher, E. S. und McWilliams-Koeppen, P. (1998): Soluble tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in human colostrum and milk bind to TNF-alpha and neutralize TNF-alpha bioactivity, *Pediatr Res* (Band 44), Nr. 1, Seite 37-42.
- Carlström G., Jalling B. (1970): Cytomegalovirus infections in different groups of paediatric patients, *Acta Paediatr. Scand* (Band 59), Seite 303-309.
- Castillo, J. P. und Kowalik, T. F. (2004): Hcmv Infection: Modulating the Cell Cycle and Cell Death, *Int Rev Immunol* (Band 23), Nr. 1-2, Seite 113-139.
- Chang, C. P.; Malone, C. L. und Stinski, M. F. (1989): A human cytomegalovirus early gene has three inducible promoters that are regulated differentially at various times after infection, *J Virol* (Band 63), Nr. 1, Seite 281-90.
- Cherrington, J. M.; Khoury, E. L. und Mocarski, E. S. (1991): Human cytomegalovirus ie2 negatively regulates alpha gene expression via a short target sequence near the transcription start site, *J Virol* (Band 65), Nr. 2, Seite 887-96.
- Chou SW. (1989): Reactivation and recombination of multiple cytomegalovirus strains from individual organ donors, *J infect Dis* (Band 160), Nr. 1, Seite 11-15.
- Clarke NM., May JT. (2000): Effect of antimicrobial factors in human milk on rhinoviruses and milk-borne cytomegalovirus in vitro, *J Med Microbiol* (Band 49), Seite 719-23.
- Compton, T.; Nowlin, D. M. und Cooper, N. R. (1993): Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate, *Virology* (Band 193), Nr. 2, Seite 834-41.
- Cox DB., Owens RA., Hartmann PE. (1996): Blood and milk prolactin and the rate of milk synthesis in women, *Exp Physiol.* (Band 81), Seite 1007-20.
- Dardenne M., de Moraes MC., Kelly PA., Gagnerault MC. (1994): Prolactin Receptor Expression in Human Hematopoietic Tissues analyzed by Flow Cytometry, *Endocrinology* (Band 134), Seite 2108-2114.
- de Graan-Hentzen, Y. C.; Gratama, J. W.; Mudde, G. C.; Verdonck, L. F.; Houbiers, J. G.; Brand, A.; Sebens, F. W.; van Loon, A. M.; The, T. H.; Willemze, R. und et al. (1989): Prevention of primary cytomegalovirus infection in patients with hematologic malignancies by intensive white cell depletion of blood products, *Transfusion* (Band 29), Nr. 9, Seite 757-60.
- Döcke, W. D.; Prösch, S.; Fietze, E.; Kimel, V.; Zuckermann, H.; Klug, C.; Syrbe, U.; Kruger, D. H.; von Baehr, R. und Volk, H. D. (1994): Cytomegalovirus reactivation and tumour necrosis factor, *Lancet* (Band 343), Nr. 8892, Seite 268-9.
- Dogusan, Z.; Hooghe, R.; Verdood, P. und Hooghe-Peters, E. L. (2001): Cytokine-like effects of prolactin in human mononuclear and polymorphonuclear leukocytes, *J Neuroimmunol* (Band 120), Nr. 1-2, Seite 58-66.
- Doniger, J.; Muralidhar, S. und Rosenthal, L. J. (1999): Human cytomegalovirus and human herpesvirus 6 genes that transform and transactivate, *Clin Microbiol Rev* (Band 12), Nr. 3, Seite 367-82.
- Doppler, W.; Groner, B. und Ball, R. K. (1989): Prolactin and glucocorticoid hormones synergistically induce expression of transfected rat beta-casein gene promoter constructs

- in a mammary epithelial cell line, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 86), Nr. 1, Seite 104-8.
- Doppler W., Hock W., Hofer P., Groner b., Ball RK. (1990): Prolactin and glucocorticoid hormones control transcription of the beta-casein gene by kinetically distinct mechanisms., *Mol Endocrinol*, Nr. 4, Seite 912-919.
- Doppler W., Welte T., Philipp S. (1995): CCAAT/Enhancer-binding Protein Isoforms B und A are expressed in Mammary Epithelial Cells and bind to multiple Sites in the b-casein Gene Promoter, *J. Biol. Chem.* (Band 270), Nr. 30, Seite 17962-9.
- Dvorak, B.; Fituch, C. C.; Williams, C. S.; Hurst, N. M. und Schanler, R. J. (2003): Increased epidermal growth factor levels in human milk of mothers with extremely premature infants, *Pediatr Res* (Band 54), Nr. 1, Seite 15-9.
- Dworsky M., Stagno S., Pass RF., Cassady G., Alford C. (1982): Persistence of cytomegalovirus in human milk after storage, *J Pediatr* (Band 101), Seite 440-3.
- Dworsky M., Yow M., Stagno S., Pass RF., Alford C. (1983): Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy, *Pediatrics* (Band 72), Seite 295-9.
- Eales-Reynolds, L. J.; Laver, H. und Mojtahedi, H. (2001): Evidence for the expression of the EGF receptor on human monocytic cells, *Cytokine* (Band 16), Nr. 5, Seite 169-72.
- Eglinton BA., Robertson DM., Cummins AG. (1994): Phenotype of T cells, their soluble receptors levels, and cytokine profile of human breast milk, *Immunology and Cell Biology* (Band 72), Seite 306.
- Fairley JA., Baille J., Bain M., Sinclair JH. (2002): Human cytomegalovirus infection inhibits epidermal growth factor (EGF) signalling by targeting EGF receptors, *J. of Gen. Virology* (Band 83), Seite 2803-2810.
- Fickenscher H., Stamminger T., Rueger R., Felchenstein B. (1989): The Role of a Repetitive Palindromic Sequence Element in the Human Cytomegalovirus Major Immediate Early Enhancer, *J Gen Virol* (Band 70), Seite 107-123.
- Fietze, E.; Prosch, S.; Reinke, P.; Stein, J.; Docke, W. D.; Staffa, G.; Loning, S.; Devaux, S.; Emmrich, F.; von Baehr, R. und et al. (1994): Cytomegalovirus infection in transplant recipients. The role of tumor necrosis factor, *Transplantation* (Band 58), Nr. 6, Seite 675-80.
- Fortunato, E. A. und Spector, D. H. (1999): Regulation of human cytomegalovirus gene expression, *Adv Virus Res* (Band 54), Seite 61-128.
- Fries BC., Chou S., Boeckh M., Torok-Strob B. (1994): Frequency distribution of cytomegalovirus Envelope Glycoprotein Genotypes in bone marrow Transplant Recipients, *J infect Dis* (Band 169), Seite 769-74.
- Gawn, J. M. und Greaves, R. F. (2002): Absence of IE1 p72 protein function during low-multiplicity infection by human cytomegalovirus results in a broad block to viral delayed-early gene expression, *J Virol* (Band 76), Nr. 9, Seite 4441-55.
- Gerna G., Baldanti F., Zavattoni M., Sarasini A., Percivalle E., Revello MG (1992): Monitoring of ganciclovir sensitivity of multiple human cytomegalovirus strains coinfecting blood of an AIDS patient by an immediate-early antigen plaque assay, *Antivir Res* (Band 19), Seite 333-345.
- Glaser, R.; Kiecolt-Glaser, J. K.; Speicher, C. E. und Holliday, J. E. (1985): Stress, loneliness, and changes in herpesvirus latency, *J Behav Med* (Band 8), Nr. 3, Seite 249-60.
- Goldblum RM., Dill CW., Albrecht TB., Alford ES., Garza C., Goldman AS. (1984): Rapid high-temperature treatment of human milk, *J Pediatr* (Band 104), Nr. 380-5.
- Goldman AS. (2002): Evolution of the Mammary Gland System and the Ontogeny of the Immune System, *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* (Band 7), Nr. 3, Seite 277-288.

- Grattan, M. T.; Moreno-Cabral, C. E.; Starnes, V. A.; Oyer, P. E.; Stinson, E. B. und Shumway, N. E. (1989): Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis, *Jama* (Band 261), Nr. 24, Seite 3561-6.
- Greaves, R. F. und Mocarski, E. S. (1998): Defective growth correlates with reduced accumulation of a viral DNA replication protein after low-multiplicity infection by a human cytomegalovirus ie1 mutant, *J Virol* (Band 72), Nr. 1, Seite 366-79.
- Griffiths PD. (2002): Strategies to prevent CMV infection in the neonate, *Semin Neonatol* (Band 7), Seite 293-299.
- Gupta, D. (1983): Hormones and human milk, *Endocrinol Exp* (Band 17), Nr. 3-4, Seite 359-70.
- Hahn, G.; Jores, R. und Mocarski, E. S. (1998): Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 95), Nr. 7, Seite 3937-42.
- Hamprecht K., Maschmann J., Vochem M., Dietz K., Speer CP., Jahn G. (2001): Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding, *Lancet* (Band 357), Nr. 513-18.
- Hamprecht K., Steinmassl M., Einsele H., Jahn G. (1998 a): Discordant detection of human cytomegalovirus DNA from peripheral blood mononuclear cells, granulocytes and plasma: correlation to viremia and HCMV infection, *J Clin Virol* (Band 11(2)), Seite 125-36.
- Hamprecht K., Vochem M., Baumeister A., Boniek M., Speer CP., Jahn G. (1998 b): Detection of cytomegaloviral DNA in human milk cells and cell free milk whey by nested PCR, *J Virol Methods* (Band 70), Nr. 167-76.
- Hamprecht K., Witzel S., Maschmann J., Speer CP., Jahn G. (2000): Transmission of cytomegalovirus infection through breast milk in term and preterm infants, in: *Short and Long term Effects of breast feeding on Child Health*, Berthold Koletzko, Kluwer Academic /Plenum Publishers.
- Hanson, L. A. (1998): Breastfeeding provides passive and likely long-lasting active immunity, *Ann Allergy Asthma Immunol* (Band 81), Nr. 6, Seite 523-33; quiz 533-4, 537.
- Harmesen, M. C.; Swart, P. J.; de Bethune, M. P.; Pauwels, R.; De Clercq, E.; The, T. H. und Meijer, D. K. (1995): Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro, *J Infect Dis* (Band 172), Nr. 2, Seite 380-8.
- Hawkes, J. S.; Bryan, D. L.; James, M. J. und Gibson, R. A. (1999): Cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, and TGF- $\beta$ 2) and prostaglandin E2 in human milk during the first three months postpartum, *Pediatr Res* (Band 46), Nr. 2, Seite 194-9.
- Hayes K., Gibas H. (1971): Placental cytomegalovirus infection without fetal involvement following primary infection in pregnancy, *J Pediatr* (Band 79), Seite 401-405.
- He J., Furmanski P. (1995): Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA, *Nature* (Band 373), Seite 721-24.
- Hendrix, M. G.; Salimans, M. M.; van Boven, C. P. und Bruggeman, C. A. (1990): High prevalence of latently present cytomegalovirus in arterial walls of patients suffering from grade III atherosclerosis, *Am J Pathol* (Band 136), Nr. 1, Seite 23-8.
- Hertel, L.; Lacaille, V. G.; Strobl, H.; Mellins, E. D. und Mocarski, E. S. (2003): Susceptibility of immature and mature Langerhans cell-type dendritic cells to infection and immunomodulation by human cytomegalovirus, *J Virol* (Band 77), Nr. 13, Seite 7563-74.
- Hirota K., Muraguchi K., Watabe N., Okumura M., Kozu M., Takahashi K., Machida Y., Funayama Y., Oshima T., Numazaki Y. (1992): Prospective Study on maternal, intrauterine and perinatal infections with Cytomegalovirus in Japan during 1976-1990, *J Med Virol* (Band 37), Seite 303-306.

- Ho M. (1991): Cytomegalovirus: biology and infection (Band New York), Plenum Publ. Corp., New York.
- Hotsubo T., Nagata N., Shimada M., Yoshida K., Fujinaga K., Chiba S. (1994): Detection of human cytomegalovirus DNA in breast milk by means of polymerase chain reaction, *Microbiol Immunol* (Band 38), Seite 809-811.
- Hummel, M. und Abecassis, M. M. (2002): A model for reactivation of CMV from latency, *J Clin Virol* (Band 25 Suppl 2), Seite S123-36.
- Hunninghake, G. W.; Monick, M. M.; Liu, B. und Stinski, M. F. (1989): The promoter-regulatory region of the major immediate-early gene of human cytomegalovirus responds to T-lymphocyte stimulation and contains functional cyclic AMP-response elements, *J Virol* (Band 63), Nr. 7, Seite 3026-33.
- Isaacs, C. E.; Xu, W.; Kascsak, R. und Pullarkat, R. (2000): Vitamin A in milk can potentially reduce the replication of enveloped viruses in infants, *Adv Exp Med Biol* (Band 478), Seite 377-8.
- Iskenderian, A. C.; Huang, L.; Reilly, A.; Stenberg, R. M. und Anders, D. G. (1996): Four of eleven loci required for transient complementation of human cytomegalovirus DNA replication cooperate to activate expression of replication genes, *J Virol* (Band 70), Nr. 1, Seite 383-92.
- Isomura, H. und Stinski, M. F. (2003): The human cytomegalovirus major immediate-early enhancer determines the efficiency of immediate-early gene transcription and viral replication in permissive cells at low multiplicity of infection, *J Virol* (Band 77), Nr. 6, Seite 3602-14.
- Jabs D. A., Enger C., Bartlett J. G. (1989): Cytomegalovirus retinitis and acquired immunodeficiency syndrome, *Arch. Ophthalmol.* (Band 107), Seite 75–80.
- Jesionek, K. (1904): Ueber einen befund von protozoen-artigen gebilden in den organen eines hereditarluetischen foetus, *Munch Med Wochenschr* (Band 51), Nr. 1905-1907.
- Kahl, M.; Siegel-Axel, D.; Stenglein, S.; Jahn, G. und Sinzger, C. (2000): Efficient lytic infection of human arterial endothelial cells by human cytomegalovirus strains, *J Virol* (Band 74), Nr. 16, Seite 7628-35.
- Kaufmann, R. und Foxman, B. (1991): Mastitis among lactating women: occurrence and risk factors, *Soc Sci Med* (Band 33), Nr. 6, Seite 701-5.
- Keller, M. J.; Wheeler, D. G.; Cooper, E. und Meier, J. L. (2003): Role of the human cytomegalovirus major immediate-early promoter's 19-base-pair-repeat cyclic AMP-response element in acutely infected cells, *J Virol* (Band 77), Nr. 12, Seite 6666-75.
- Klein JM., Fritz BL., McCarthy TA., Wohlford-Lenane CL., Synder JM (1995): Localization of epidermal growth factor receptor in alveolar epithelium during human fetal lung development in vitro, *Experimental Lung Research* (Band 21), Seite 917-939.
- Kline, J. N.; Hunninghake, G. M.; He, B.; Monick, M. M. und Hunninghake, G. W. (1998): Synergistic activation of the human cytomegalovirus major immediate early promoter by prostaglandin E2 and cytokines, *Exp Lung Res* (Band 24), Nr. 1, Seite 3-14.
- Kondo, K. und Mocarski, E. S. (1995): Cytomegalovirus latency and latency-specific transcription in hematopoietic progenitors, *Scand J Infect Dis Suppl* (Band 99), Seite 63-7.
- Kondo, K.; Xu, J. und Mocarski, E. S. (1996): Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 93), Nr. 20, Seite 11137-42.
- Kourtis, A. P.; Butera, S.; Ibegbu, C.; Beled, L. und Duerr, A. (2003): Breast milk and HIV-1: vector of transmission or vehicle of protection?, *Lancet Infect Dis* (Band 3), Nr. 12, Seite 786-93.

- Krech U. (1973): Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world, *Bull World Health ORgan* (Band 49), Nr. 1, Seite 103.
- Kulski, J. K. und Hartmann, P. E. (1981): Changes in the concentration of cortisol in milk during different stages of human lactation, *Aust J Exp Biol Med Sci* (Band 59), Nr. Pt 6, Seite 769-78.
- Kumar, M. L.; Nankervis, G. A.; Jacobs, I. B.; Ernhart, C. B.; Glasson, C. E.; McMillan, P. M. und Gold, E. (1984): Congenital and postnatally acquired cytomegalovirus infections: long-term follow-up, *J Pediatr* (Band 104), Nr. 5, Seite 674-9.
- Kunz, C.; Rodriguez-Palmero, M.; Koletzko, B. und Jensen, R. (1999): Nutritional and biochemical properties of human milk, Part I: General aspects, proteins, and carbohydrates, *Clin Perinatol* (Band 26), Nr. 2, Seite 307-33.
- Laiho, K.; Lampi, A. M.; Hamalainen, M.; Moilanen, E.; Piironen, V.; Arvola, T.; Syrjanen, S. und Isolauri, E. (2003): Breast milk fatty acids, eicosanoids, and cytokines in mothers with and without allergic disease, *Pediatr Res* (Band 53), Nr. 4, Seite 642-7.
- Lamberson HV., Dock NL. (1992): Prevention of transfusion-transmitted cytomegalovirus infection, *Transfusion* (Band 32), Nr. 1, Seite 196-201.
- Lang DJ., Kummer JF (1975): Cytomegalovirus in semen: observation in selected populations, *J of infectious diseases* (Band 132), Seite 472-472.
- Larsson, S.; Soderberg-Naucler, C.; Wang, F. Z. und Moller, E. (1998): Cytomegalovirus DNA can be detected in peripheral blood mononuclear cells from all seropositive and most seronegative healthy blood donors over time, *Transfusion* (Band 38), Nr. 3, Seite 271-8.
- Lathey, J. L. und Spector, S. A. (1991): Unrestricted replication of human cytomegalovirus in hydrocortisone-treated macrophages, *J Virol* (Band 65), Nr. 11, Seite 6371-5.
- Lee, C. H.; Lee, G. C.; Chan, Y. J.; Chiou, C. J.; Ahn, J. H. und Hayward, G. S. (1999): Factors affecting human cytomegalovirus gene expression in human monocyte cell lines, *Mol Cells* (Band 9), Nr. 1, Seite 37-44.
- Lemstrom, K. B.; Bruning, J. H.; Bruggeman, C. A.; Lautenschlager, I. T. und Hayry, P. J. (1993): Cytomegalovirus infection enhances smooth muscle cell proliferation and intimal thickening of rat aortic allografts, *J Clin Invest* (Band 92), Nr. 2, Seite 549-58.
- Leonardi, G. P. und Lipson, S. M. (1992): Enhanced detection of cytomegalovirus in shell vial culture following MRC-5 monolayer pretreatment with glucocorticoids, *Zentralbl Bakteriologie* (Band 277), Nr. 1, Seite 90-9.
- Li, F.; Yin, M.; Van Dam, J. G.; Grauls, G.; Rozing, J. und Bruggeman, C. A. (1998): Cytomegalovirus infection enhances the neointima formation in rat aortic allografts: effect of major histocompatibility complex class I and class II antigen differences, *Transplantation* (Band 65), Nr. 10, Seite 1298-304.
- Liu, B. und Stinski, M. F. (1992): Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cis-acting elements, *J Virol* (Band 66), Nr. 7, Seite 4434-44.
- Liu, R.; Baillie, J.; Sissons, J. G. und Sinclair, J. H. (1994): The transcription factor YY1 binds to negative regulatory elements in the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter and mediates repression in non-permissive cells, *Nucleic Acids Res* (Band 22), Nr. 13, Seite 2453-9.
- Lodish H., Baltimore D., Berk A., Zipursky SL., Matudaira P., Darnell J. (1995): *Molecular cell biology*, W.H. Freeman and Company, New York, 3rd Edition.
- Löffler G., Petrides P. (2003): *Biochemie und Pathobiochemie*, Thieme Verlag, 7. Auflage.
- Lönnerdal B. (2003): Nutritional and physiologic significance of human milk proteins, *Am J Nutr.* (Band 77).

- Lunetta, J. M.; Wiedeman, J. A. (2000): Latency-associated sense transcripts are expressed during in vitro human cytomegalovirus productive infection, *Virology* (Band 278), Nr. 2, Seite 467-76.
- Maidji E., Percivalle E., Gerna G., Fisher S., Pereira L. (2002): Transmission of Human Cytomegalovirus from Infected Uterine Microvasvular Endothelial Cells to Differentiating/Invasinve Placental Cytotrophoblasts, *Virology* (Band 304), Seite 53-69.
- Malone, C. L.; Vesole, D. H. und Stinski, M. F. (1990): Transactivation of a human cytomegalovirus early promoter by gene products from the immediate-early gene IE2 and augmentation by IE1: mutational analysis of the viral proteins, *J Virol* (Band 64), Nr. 4, Seite 1498-506.
- Marchini, A.; Liu, H. und Zhu, H. (2001): Human cytomegalovirus with IE-2 (UL122) deleted fails to express early lytic genes, *J Virol* (Band 75), Nr. 4, Seite 1870-8.
- Maschmann J., Hamprecht K., Dietz K., Jahn G., Speer CP. (2001): Cytomegalovirus infection of extremely low-birth weight infants via breast milk, *Clin Infect Dis* (Band 33), Seite 1998-2003.
- Maschmann J., Spper CP., Jahn G. (1999): Inactivation of cytomegalovirus (CMV) in breast milk (Abstract 208), European Society of Paediatric Research, Annual Meeting, 26-29 June. *Pediatr Res*. 45:924.
- McKay, L. I. und Cidlowski, J. A. (1999): Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways, *Endocr Rev* (Band 20), Nr. 4, Seite 435-59.
- Meier, J. L. und Pruessner, J. A. (2000): The human cytomegalovirus major immediate-early distal enhancer region is required for efficient viral replication and immediate-early gene expression, *J Virol* (Band 74), Nr. 4, Seite 1602-13.
- Meier, J. L. und Stinski, M. F. (1996): Regulation of human cytomegalovirus immediate-early gene expression, *Intervirol* (Band 39), Nr. 5-6, Seite 331-42.
- Meier, J. L. und Stinski, M. F. (1997): Effect of a modulator deletion on transcription of the human cytomegalovirus major immediate-early genes in infected undifferentiated and differentiated cells, *J Virol* (Band 71), Nr. 2, Seite 1246-55.
- Meier, J.; Lienicke, U.; Tschirch, E.; Kruger, D. H.; Wauer, R. R. und Prösch, S. (2005): Human cytomegalovirus reactivation during lactation and mother-to-child transmission in preterm infants, *J Clin Microbiol* (Band 43), Nr. 3, Seite 1318-24.
- Melnick, J. L.; Petrie, B. L.; Dreesman, G. R.; Burek, J.; McCollum, C. H. und DeBakey, M. E. (1983): Cytomegalovirus antigen within human arterial smooth muscle cells, *Lancet* (Band 2), Nr. 8351, Seite 644-7.
- Mendelson, M.; Monard, S.; Sissons, P. und Sinclair, J. (1996): Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors, *J Gen Virol* (Band 77 ( Pt 12)), Seite 3099-102.
- Michalsky, M. P.; Lara-Marquez, M.; Chun, L. und Besner, G. E. (2002): Heparin-binding EGF-like growth factor is present in human amniotic fluid and breast milk, *J Pediatr Surg* (Band 37), Nr. 1, Seite 1-6.
- Michie, C. A.; Tantscher, E.; Schall, T. und Rot, A. (1998): Physiological secretion of chemokines in human breast milk, *Eur Cytokine Netw* (Band 9), Nr. 2, Seite 123-9.
- Miettinen, P. J.; Berger, J. E.; Meneses, J.; Phung, Y.; Pedersen, R. A.; Werb, Z. und Derynck, R. (1995): Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor, *Nature* (Band 376), Nr. 6538, Seite 337-41.
- Miettinen, P. J.; Warburton, D.; Bu, D.; Zhao, J. S.; Berger, J. E.; Minoo, P.; Koivisto, T.; Allen, L.; Dobbs, L.; Werb, Z. und Derynck, R. (1997): Impaired lung branching morphogenesis in the absence of functional EGF receptor, *Dev Biol* (Band 186), Nr. 2, Seite 224-36.



- Miller, W. J.; McCullough, J.; Balfour, H. H., Jr.; Haake, R. J.; Ramsay, N. K.; Goldman, A.; Bowman, R. und Kersey, J. (1991): Prevention of cytomegalovirus infection following bone marrow transplantation: a randomized trial of blood product screening, *Bone Marrow Transplant* (Band 7), Nr. 3, Seite 227-34.
- Minder WH. (1953): Die aetiologie der cytomegalia infantium, *Schweizer Medizinische Wochenschrift* (Band 83), Seite 1180-1182.
- Mocarski, E. S., Jr. (2002): Virus self-improvement through inflammation: no pain, no gain, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 99), Nr. 6, Seite 3362-4.
- Mocarski, E. S.; Kemble, G. W.; Lyle, J. M. und Greaves, R. F. (1996): A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1(491aa) is replication defective due to a failure in autoregulation, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 93), Nr. 21, Seite 11321-6.
- Mocarski ES., Courcelle T. (2001): Cytomegalovirus and their replication, Knipe, D.; Howley, P., *Fields Virology* Seite 2629-2673, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Moriuchi H., Moriuchi M. (2001): A milk protein lactoferrin enhances human T cell leukemia virus type 1 and supresses HIV-1 infection, *J Immunol* (Band 166), Seite 4231-4236.
- Moriuchi H., Moriuchi M. (2002): Transforming Growth Factor-beta enhances Human T-cell Leukemia Virus type I Infection, *J Med Virol* (Band 67), Seite 427-230.
- Mosca F., Pugni L., Barbi M., Binda S. (2001): Transmission of cytomegalovirus, *Lancet* (Band 357), Seite 1800.
- Newell ML. (2000): Mother-to-child transmission of cytomegalovirus, in *Congenital and perinatal infections*, Cambridge University Press, Eds.: Newell ML. and McIntyre J., Seite 122-134.
- Nguyen, D. A.; Parlow, A. F. und Neville, M. C. (2001): Hormonal regulation of tight junction closure in the mouse mammary epithelium during the transition from pregnancy to lactation, *J Endocrinol* (Band 170), Nr. 2, Seite 347-56.
- Niller, H. H. und Hennighausen, L. (1991): Formation of several specific nucleoprotein complexes on the human cytomegalovirus immediate early enhancer, *Nucleic Acids Res* (Band 19), Nr. 13, Seite 3715-21.
- Nishiguchi Y., Hibasami H., Konada Y., Sakurai M., Nakashima K. (1993): Human promyelocytic cell line HL60 has the specific binding sites for prolactin and its ornithine decarboxylase, DNA synthesis and cellular proliferation are induced by prolactin, *Leukemia Research* (Band 17), Nr. 8, Seite 633-637.
- Numazaki K. (1997): Human cytomegalovirus infection of breast milk, *FEMS Immunol MED Microbiol* (Band 18), Seite 91-98.
- Ogra, S. S.; Weintraub, D. und Ogra, P. L. (1977): Immunologic aspects of human colostrum and milk. III. Fate and absorption of cellular and soluble components in the gastrointestinal tract of the newborn, *J Immunol* (Band 119), Nr. 1, Seite 245-8.
- Olive DM., Simsek M., Al-Mufti S. (1989): Polymerase chain reaction for detection of human cytomegalovirus, *J Clin Microbiol* (Band 27), Nr. 6, Seite 1238-42.
- Orti, E.; Mendel, D. B.; Smith, L. I. und Munck, A. (1989): Agonist-dependent phosphorylation and nuclear dephosphorylation of glucocorticoid receptors in intact cells, *J Biol Chem* (Band 264), Nr. 17, Seite 9728-31.
- Ost, L.; Wettrell, G.; Bjorkhem, I. und Rane, A. (1985): Prednisolone excretion in human milk, *J Pediatr* (Band 106), Nr. 6, Seite 1008-11.
- Ozar Jasmin. (2002): Untersuchung zur Rolle der cAMP responsive elements im Immediate Early Enhancer des Cytomegalievirus für die stressabhängige Stimulierung, Diplomarbeit.

- Paryani SG., Yeager AS., Hosford-Dunn H., Johnson SJ., Malachowski N., Ariagno RL., Stevenson DK. (1985): Sequelae of acquired cytomegalovirus infection in premature and sick term infants, *J Pediatr* (Band 107), Seite 451-6.
- Pass RF. (2001): Cytomegalovirus, Knipe, D.; Howley, P., *Fields Virology* Seite 2675-2705, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Pass RF., Stagno S., Myers GJ., Alford CA (1980): Outcome of symptomatic congenital cytomegalovirus infection: results of long-term longitudinal follow-up, *Pediatrics* (Band 66), Seite 758-62.
- Patacchioli, F. R.; Cigliana, G.; Cilumbriello, A.; Perrone, G.; Capri, O.; Alema, G. S.; Zichella, L. und Angelucci, L. (1992): Maternal plasma and milk free cortisol during the first 3 days of breast-feeding following spontaneous delivery or elective cesarean section, *Gynecol Obstet Invest* (Band 34), Nr. 3, Seite 159-63.
- Peckham CS. (1991): Cytomegalovirus infection, congenital and neonatal disease, *Scand J Infect Suppl.* (Band 78), Seite 82-87.
- Peckham CS., Stark O., Dudgeon JA., Martin JAM., Hawkins G. (1987): Congenital cytomegalovirus infection, a cause of sensorineural hearing loss, *Arch Dis Child* (Band 62), Seite 1233-7.
- Pereira L., Maidji E., McDonagh S., Genbacev O., Ma W., Fisher S. (2003): Decidua Functions as a reservoir for transmission of Human Cytomegalovirus to the Placenta in Early Gestation, Vortrag im Rahmen des 9. Intern Cytomegalovirus Workshop (Maastricht, 20-25 Mai 2003).
- Picard, D. und Yamamoto, K. R. (1987): Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor, *Embo J* (Band 6), Nr. 11, Seite 3333-40.
- Plachter B., Sinzger C., Jahn G. (1996): Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus, *Adv Virus Res* (Band 46), Seite 195-261.
- Portelli, J.; Gordon, A. und May, J. T. (1998): Effect of compounds with antibacterial activities in human milk on respiratory syncytial virus and cytomegalovirus in vitro, *J Med Microbiol* (Band 47), Nr. 11, Seite 1015-8.
- Pratt, W. B. (1993): The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor, *J Biol Chem* (Band 268), Nr. 29, Seite 21455-8.
- Prix, L.; Kuner, R.; Speer, C. P.; Jahn, G. und Hamprecht, K. (1998): Evaluation of restriction fragment length polymorphism analysis of the UL10-UL13 genomic region for rapid identification of human cytomegalovirus strains, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (Band 17), Nr. 7, Seite 525-8.
- Prösch S., Docke WD., Reinke P., Volk HD., Kruger DH. (1999): Human cytomegalovirus reactivation in bone-marrow-derived granulocyte/monocyte progenitor cells and mature monocytes, *Intervirology* (Band 42), Nr. 5-6, Seite 308-13.
- Prösch S., Heine AK., Volk HD., Kruger DH. (2001): CCAAT/enhancer-binding proteins alpha and beta negatively influence the capacity of tumor necrosis factor alpha to up-regulate the human cytomegalovirus IE1/2 enhancer/promoter by nuclear factor kappaB during monocyte differentiation, *Biol Chem* (Band 276), Nr. 44, Seite 40712-20.
- Prösch S., Kimel V., Dawydowa I., Kruger DH. (1992): Monitoring of patients for cytomegalovirus after organ transplantation by centrifugation culture and PCR., *J Med Virol* (Band 38), Nr. 4, Seite 246-51.
- Prösch S., Lienicke U., Priemer C., Flunker G., Seidel WF., Kruger DH., Wauer RR. (2002 b): Human adenovirus and human cytomegalovirus infections in preterm newborns: no association with bronchopulmonary dysplasia, *Pediatr Res* (Band 52), Nr. 2, Seite 219-24.

- Prösch S., Reinke P., Volk HD., Kruger DH. (2000 b): Cytomegalovirus infections in patients after organ transplantation. *Epidemiology, diagnosis, therapy, Internist* (Band 31), Nr. 11, Seite 1253-60.
- Prösch S., Staak K., Stein J., Liebenthal C., Stamminger T., Volk HD., Kruger DH. (1995): Stimulation of the human cytomegalovirus IE enhancer/promoter in HL-60 cells by TNFalpha is mediated via induction of NF-kappaB, *Virology* (Band 208), Nr. 1, Seite 197-206.
- Prösch, S.; Wendt, C. E.; Reinke, P.; Priemer, C.; Oppert, M.; Kruger, D. H.; Volk, H. D. und Docke, W. D. (2000 a): A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation, *Virology* (Band 272), Nr. 2, Seite 357-65.
- Prösch S., Wendt C., Wuttke R., Beutler T., Asadullah K., Krueger DH., Volk HD (eingereicht): Glucocorticoid stimulation of human cytomegalovirus replication: Identification of functional active glucocorticoid receptor responsive elements (GRE) in the human cytomegalovirus IE1/2 enhancer stimulated by trans-activating properties of glucocorticoids, in press.
- Prösch S., Wuttke R., Kruger DH., Volk HD. (2002): NF-kappaB--a potential therapeutic target for inhibition of human cytomegalovirus (re)activation?, *Biol Chem* (Band 383), Nr. 10, Seite 1601-9.
- Rahbar, A. R.; Sundqvist, V. A.; Wirgart, B. Z.; Grillner, L. und Soderberg-Naucler, C. (2004): Recognition of cytomegalovirus clinical isolate antigens by sera from cytomegalovirus-negative blood donors, *Transfusion* (Band 44), Nr. 7, Seite 1059-66.
- Ramsey MEB., Miller E., Peckham CS. (1991): Outcome of confirmed symptomatic congenital cytomegalovirus infection, *Arch Dis Child* (Band 66), Seite 1068-9.
- Read LC., Upton FM., Francis GL., Wallace JC., Dahlenberg GW, Ballard FJ. (1984): Changes in the growth-promoting activity of human milk during lactation, *Pediatr Res* (Band 18), Seite 133-139.
- Reinke, P.; Fietze, E.; Ode-Hakim, S.; Prosch, S.; Lippert, J.; Ewert, R. und Volk, H. D. (1994): Late-acute renal allograft rejection and symptomless cytomegalovirus infection, *Lancet* (Band 344), Nr. 8939-8940, Seite 1737-8.
- Revello MG. (2003): Pathogenesis of congenital HCMV infection, Vortrag im Rahmen des 9. Intern Cytomegalovirus Workshop (Maastricht, 20-25 Mai 2003).
- Reynolds DW., Stagno S., Hosty TS., Tiller M., Alford CA Jr. (1973): Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection, *N Engl J Med* (Band 289), Seite 1-5.
- Rodriguez-Palmero, M.; Koletzko, B.; Kunz, C. und Jensen, R. (1999): Nutritional and biochemical properties of human milk: II. Lipids, micronutrients, and bioactive factors, *Clin Perinatol* (Band 26), Nr. 2, Seite 335-59.
- Rowe WP., Hartley JW., Waterman S., et al (1956): Cytopathogenic agent resembling salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids, *Proc Soc Exp Biol Med* (Band 92), Seite 418-424.
- Rubin, R. H. (1990): Impact of cytomegalovirus infection on organ transplant recipients, *Rev Infect Dis* (Band 12 Suppl 7), Seite S754-66.
- Rudloff, H. E.; Schmalstieg, F. C., Jr.; Mushtaha, A. A.; Palkowetz, K. H.; Liu, S. K. und Goldman, A. S. (1992): Tumor necrosis factor-alpha in human milk, *Pediatr Res* (Band 31), Nr. 1, Seite 29-33.
- Saito S., Yoshida M., Ichijo M., Ishizaka S., Tsuji T. (1994): Transforming growth factor-beta in human milk, *Clin Exp Immunol*, Seite 220-224.
- Samanta, M.; Harkins, L.; Klemm, K.; Britt, W. J. und Cobbs, C. S. (2003): High Prevalence of Human Cytomegalovirus in Prostatic Intraepithelial Neoplasia and Prostatic Carcinoma, *J Urol* (Band 170), Nr. 3, Seite 998-1002.

- Sambucetti LC., Cherrington JM., Wilkinson GW., Mocarski ES (1989): NF-kappa B activation of cytomegalovirus enhancer is mediated by a viral transactivator and by T cell stimulation, *EMBO* (Band 8), Nr. 13, Seite 4251-8.
- Semba, R. D.; Kumwenda, N.; Hoover, D. R.; Taha, T. E.; Quinn, T. C.; Mtimavalye, L.; Biggar, R. J.; Broadhead, R.; Miotti, P. G.; Sokoll, L. J.; van der Hoeven, L. und Chipangwi, J. D. (1999): Human immunodeficiency virus load in breast milk, mastitis, and mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1, *J Infect Dis* (Band 180), Nr. 1, Seite 93-8.
- Sharland M., Khare M., Bedford-Russell A. (2002): Prevention of postnatal cytomegalovirus infection in preterm infants, *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* (Band 86), Seite f140.
- Sinclair, J. und Sissons, P. (1996): Latent and persistent infections of monocytes and macrophages, *Intervirology* (Band 39), Nr. 5-6, Seite 293-301.
- Sinzger, C. und Jahn, G. (1996): Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis, *Intervirology* (Band 39), Nr. 5-6, Seite 302-19.
- Sinzger, C.; Muntefering, H.; Loning, T.; Stoss, H.; Plachter, B. und Jahn, G. (1993): Cell types infected in human cytomegalovirus placentitis identified by immunohistochemical double staining, *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* (Band 423), Nr. 4, Seite 249-56.
- Sissons, J. G.; Bain, M. und Wills, M. R. (2002): Latency and reactivation of human cytomegalovirus, *J Infect* (Band 44), Nr. 2, Seite 73-7.
- Slobedman, B. und Mocarski, E. S. (1999): Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus, *J Virol* (Band 73), Nr. 6, Seite 4806-12.
- Smith, D. F. und Toft, D. O. (1993): Steroid receptors and their associated proteins, *Mol Endocrinol* (Band 7), Nr. 1, Seite 4-11.
- Smith MG. (1956): Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease, *Proc Soc Exp Biol Med* (Band 92), Seite 424-430.
- Soderberg-Naucler C., Fish KN., Nelson JA. (1997): Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors, *Cell* (Band 91), Nr. 1, Seite 119-26.
- Soderberg-Naucler C., Streblow DN., Fish KN., Allan-Yorke J., Smith PP., Nelson JA. (2001): Reactivation of latent human cytomegalovirus in CD14(+) monocytes is differentiation dependent, *J Virol* (Band 75), Nr. 16, Seite 7543-54.
- Son KN., Park J., Chung CK., Chung DK., Yu DY., Lee KK., Kim J. (2002): Human lactoferrin activates transcription of IL-1 beta gene in mammalian cells, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 290), Seite 236-41.
- Sone, S.; Tsutsumi, H.; Takeuchi, R.; Matsuda, K.; Imai, S.; Ogra, P. L. und Chiba, S. (1997): Enhanced cytokine production by milk macrophages following infection with respiratory syncytial virus, *J Leukoc Biol* (Band 61), Nr. 5, Seite 630-6.
- Spano, L. C.; Gatti, J.; Nascimento, J. P. und Leite, J. P. (2004): Prevalence of human cytomegalovirus infection in pregnant and non-pregnant women, *J Infect* (Band 48), Nr. 3, Seite 213-20.
- Spano, L. C.; Vargas, P. R.; Ribeiro, F. S.; Leite, J. P. und Nascimento, J. P. (2002): Cytomegalovirus in human abortion in Espirito Santo, Brazil, *J Clin Virol* (Band 25 Suppl 2), Seite S173-8.
- St George, K. und Rinaldo, C. R., Jr. (1994): Effects of enhancing agents on detection of cytomegalovirus in clinical specimens, *J Clin Microbiol* (Band 32), Nr. 8, Seite 2024-7.
- Staak, K.; Prosch, S.; Stein, J.; Priemer, C.; Ewert, R.; Docke, W. D.; Kruger, D. H.; Volk, H. D. und Reinke, P. (1997): Pentoxifylline promotes replication of human cytomegalovirus in vivo and in vitro, *Blood* (Band 89), Nr. 10, Seite 3682-90.

- Stagno S., Cloud AC. (1994): Working parents: The impact of day care and breast-feeding on cytomegalovirus infections in offspring, *Proc Natl. Acad. Science* (Band 91), Seite 2384-2389.
- Stagno S., Pass RF., Cloud G., Britt WJ., Henderson RE., Walton PD., Veron DA., Page F., Alford CA. (1986): Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome, *JAMA* (Band 356), Seite 1904-1908.
- Stagno S., Pass RF., Dwosky ME., Alford CA. (1983): Congenital and perinatal cytomegalovirus infections, *Semin. Perinatol* (Band 7), Seite 31-42.
- Stagno S., Reynolds DW., Pass RF., Alford CA. (1980): Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection, *N Engl J Med* (Band 302), Seite 1073-6.
- Stagno S., Reynolds DW., Tsiantos A., Fuccillo DA., Smith R., Tiller M., Alford CA. (1975): Cervical Cytomegalovirus excretion in pregnant and nonpregnant women: suppression in early gestation, *J of infectious diseases* (Band 131), Nr. 5, Seite 533-527.
- Stamminger, T.; Fickenscher, H. und Fleckenstein, B. (1990): Cell type-specific induction of the major immediate early enhancer of human cytomegalovirus by cyclic AMP, *J Gen Virol* (Band 71 ( Pt 1)), Seite 105-13.
- Stamminger, T.; Gstaiger, M.; Weinzierl, K.; Lorz, K.; Winkler, M. und Schaffner, W. (2002): Open reading frame UL26 of human cytomegalovirus encodes a novel tegument protein that contains a strong transcriptional activation domain, *J Virol* (Band 76), Nr. 10, Seite 4836-47.
- Stein J., Volk HD., Liebenthal C., Kruger DH., Prosch S. (1993): Tumour necrosis factor alpha stimulates the activity of the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter in immature monocytic cells, *J Gen Virol* (Band 74), Nr. 11, Seite 2333-8.
- Stern H., Friedman I. (1960): Intracellular formation of cytomegalovirus inclusion disease virus, *Nature* (Band 188), Seite 768-770.
- Stöcklin, E.; Wissler, M.; Moriggl, R. und Groner, B. (1997): Specific DNA binding of Stat5, but not of glucocorticoid receptor, is required for their functional cooperation in the regulation of gene transcription, *Mol Cell Biol* (Band 17), Nr. 11, Seite 6708-16.
- Stratton KR., Durch JS., Lawrence RS. (2000): Vaccines for the 21st Century, *Nat. Acad. Press*.
- Taetle, R.; Oval, J.; Smedsrud, M.; Davis, C. und Gansbacher, B. (1991): Analysis of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor action in differentiating myeloid leukemia cells: treatment with DMSO may reveal a common pathway for growth factor gene regulation, *Exp Hematol* (Band 19), Nr. 3, Seite 213-20.
- Takahata, Y.; Takada, H.; Nomura, A.; Ohshima, K.; Nakayama, H.; Tsuda, T.; Nakano, H. und Hara, T. (2001): Interleukin-18 in human milk, *Pediatr Res* (Band 50), Nr. 2, Seite 268-72.
- Tanaka, J.; Ogura, T.; Kamiya, S.; Yoshie, T.; Yabuki, Y. und Hatano, M. (1984 a): Dexamethasone enhances human cytomegalovirus replication in human epithelial cell cultures, *Virology* (Band 136), Nr. 2, Seite 448-52.
- Tanaka J., Ogura T., Kamiya S., Sato H., Yoshie D., Ogura H., Hatano M. (1984 b): Enhanced Replication of Human Cytomegalovirus in Human Fibroblasts treated with Dexamethason, *J Gen Virol* (Band 65), Seite 1759-1767.
- Taylor-Wiedeman, J.; Sissons, J. G.; Borysiewicz, L. K. und Sinclair, J. H. (1991): Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells, *J Gen Virol* (Band 72 ( Pt 9)), Seite 2059-64.
- Taylor-Wiedeman, J.; Sissons, P. und Sinclair, J. (1994): Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers, *J Virol* (Band 68), Nr. 3, Seite 1597-604.

- Toniolo, A.; Serra, C.; Conaldi, P. G.; Basolo, F.; Falcone, V. und Dolei, A. (1995): Productive HIV-1 infection of normal human mammary epithelial cells, *Aids* (Band 9), Nr. 8, Seite 859-66.
- Toro, A. I. und Ossa, J. (1996): PCR activity of CMV in healthy CMV-seropositive individuals: does latency need redefinition?, *Res Virol* (Band 147), Nr. 4, Seite 233-8.
- Van de Perre, P. (2003): Transfer of antibody via mother's milk, *Vaccine* (Band 21), Nr. 24, Seite 3374-6.
- van der Hoof, J.A.; Zach, T.L.; Adrian, T.E. (1994): *Gastrointestinal diseases*, Avery, G.B.; Fletcher, M.A.; McDonald, M.G., *Neonatology, Pathophysiology and Management of the newborn*, 4. Auflage. Auflage, Seite 206, J. B. Lippincott Company.
- van der Strate BW., Harmsen MC., Schafer P., Swart PJ., The TH., Jahn G., Speer CP., Meijer DK., Hamprecht K. (2001): Viral Load in breast milk correlates with transmission of human cytomegalovirus to preterm neonates but lactoferrin concentrations do not, *Clinical and diagnostic laboratory immunology* (Band 8), Nr. 4, Seite 818-21.
- Vochem, M. (2003): [CMV infections of the neonate: prevalence, diagnosis, therapy], *Z Geburtshilfe Neonatol* (Band 207), Nr. 3, Seite 114-8.
- Vochem M., Hamprecht K., Jahn G., Speer CP. (1998): Transmission of cytomegalovirus to preterm infants through breast milk, *Pediatr Infect Dis J* (Band 17), Seite 53-8.
- Vogelberg C., Meyer-König U., Hufert FT., Kirste G., von Laer D. (1996): Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotypes in Renal transplant recipients, *J Med Virol* (Band 50), Seite 31-34.
- Vollmer, B.; Seibold-Weiger, K.; Schmitz-Salue, C.; Hamprecht, K.; Goelz, R.; Krageloh-Mann, I. und Speer, C. P. (2004): Postnatally acquired cytomegalovirus infection via breast milk: effects on hearing and development in preterm infants, *Pediatr Infect Dis J* (Band 23), Nr. 4, Seite 322-327.
- von Glahn WC., Pappenheimer AM. (1925): Intranuclear inclusions in visceral disease, *American Journal of Pathology*, Nr. 1, Seite 445-465.
- Wallace, J. M.; Ferguson, S. J.; Loane, P.; Kell, M.; Millar, S. und Gillmore, W. S. (1997): Cytokines in human breast milk, *Br J Biomed Sci* (Band 54), Nr. 2, Seite 85-7.
- Wang, X.; Huong, S. M.; Chiu, M. L.; Raab-Traub, N. und Huang, E. S. (2003): Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus, *Nature* (Band 424), Nr. 6947, Seite 456-61.
- Wathen, M. W. und Stinski, M. F. (1982): Temporal patterns of human cytomegalovirus transcription: mapping the viral RNAs synthesized at immediate early, early, and late times after infection, *J Virol* (Band 41), Nr. 2, Seite 462-77.
- Weller TH., Macauley JC., Craig JM., Wirth P. (1957): Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease, *Proc Soc Exp Biol Med* (Band 94), Seite 4-12.
- Willumsen, J. F.; Filteau, S. M.; Coutsoudis, A.; Newell, M. L.; Rollins, N. C.; Coovadia, H. M. und Tomkins, A. M. (2003): Breastmilk RNA viral load in HIV-infected South African women: effects of subclinical mastitis and infant feeding, *Aids* (Band 17), Nr. 3, Seite 407-14.
- Xanthou, M. (1997): Human milk cells, *Acta Paediatr* (Band 86), Nr. 12, Seite 1288-90.
- Yasuda A., Kimura H., Hayakawa M., Ohshiro M., Kato Y., Matsuura O., Suzuki C. Morishima T. (2003): Evaluation of Cytomegalovirus Infections transmitted via breast milk in preterm infants with a real-time Polymerase Chain reaction Essay, *Pediatr* (Band 111), Nr. 6, Seite 1333-36.
- Yeager, A. S.; Palumbo, P. E.; Malachowski, N.; Ariagno, R. L. und Stevenson, D. K. (1983): Sequelae of maternally derived cytomegalovirus infections in premature infants, *J Pediatr* (Band 102), Nr. 6, Seite 918-22.

- Yuen, Ho (1988): Prolactin in human milk: influence of nursing and the duration of postpartum lactation, *Am J Obstet Gynecol* (Band 158), Seite 583-6.
- Zwiauer, K.; Duetsch, J.; Goriup, U.; Haas, H.; Haiden, N.; Holzmann, H.; Pietschnig, B.; Pollak, A.; Popow, T.; Rock, I.; Sperl, W. und Widhalm, K. (2003): Prävention von Muttermilch-medierten CMV-Infektionen bei Frühgeborenen, *Monatschrift Kinderheilkunde* (Band 12), Seite 1346-47.

## Anhang

### Eigene Veröffentlichungen

#### Originalpublikationen:

- 2005 Meier, J.; Lienicke, U.; Tschirch, E.; Kruger, D. H.; Wauer, R. R. and Prösch, S. (2005): Human cytomegalovirus reactivation during lactation and mother-to-child transmission in preterm infants, J Clin Microbiol 43 [3], pp. 1318-24.

Meier J, Tschirch E, Lienicke U, Wauer RR, Krüger DH, Hamprecht K, Prösch S.

Milk whey from human breast milk stimulates HCMV replication in a multifactorial process involving glucocorticoids. (*z.Z.in Arbeit*)

#### Vorträge:

- 2003 Untersuchungen zur Epidemiologie und zur Reaktivierung des Cytomegalievirus während der Laktation.  
Wissenschaftliches Kolloquium der Klinik für Neonatologie Charité-Universitätsmedizin Berlin - Mitte, 22. Oktober 2003 Berlin

Epidemiology of human cytomegalovirus infections in preterm infants and their mothers: stimulation of the HCMV IE1/2-Enhancer/Promotor by cell-free milk whey.

9<sup>th</sup> International Cytomegalovirus Workshop, 20.-25. Mai, 2003 Maastricht

#### Posterpräsentation:

- 2004 Human Cytomegalovirus mother-to child transmission in preterm infants: Mechanism of human cytomegalovirus (re)activation during lactation.  
25. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, 17.-20. März 2004, Tübingen
- 2003 Mechanism of human cytomegalovirus (re)activation during lactation: stimulation of the HCMV IE1/2-Enhancer/Promotor and viral replication by cell-free milk whey.  
14<sup>th</sup> European Students' Conference, November 5-7, 2003, Berlin



## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

|                      |                |                             |             |
|----------------------|----------------|-----------------------------|-------------|
| <b>Name:</b>         | Johannes Meier | <b>Staatsangehörigkeit:</b> | deutsch     |
| <b>Geburtsdatum:</b> | 02. März 1978  | <b>Familienstand:</b>       | ledig       |
| <b>Geburtsort::</b>  | Giessen        | <b>Konfession:</b>          | evangelisch |

### Bildungsweg:

|         |           |   |
|---------|-----------|---|
| 1983-97 | Juli      | Schul Ausbildung Rudolf-Steiner Schule, Wuppertal. Abitur (Note: 1,6)   |
| 1997    | Sept-Okt  | Pflegepraktikum im Bereich rheumatologische Orthopädie St. Josef Krankenhaus, Wuppertal   |
|         | Nov-Dez   | Pflegepraktikum im Bereich Innere Medizin im Klinikum Neviges.  |
| 1998-99 | Jan-Juli  | Friedensdienst im Rahmen eines 18-monatigen Anderen Dienstes im Ausland mit EIRENE in Compiègne (Frankreich). Arbeiten und Wohnen in einer Lebensgemeinschaft von behinderten Menschen ("Arche" von Jean Vanier).     |
| 1999    | Okt       | Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin, Charité (Reformstudiengang)  |
| 2000-06 |           | Studentisches Mitglied der Ausbildungskommission des Fakultätsrates (Charité, Humboldt Universität) bzw. Charité-Universitätsmedizin Berlin   |
| 2001-   | Juni-Aug  | Studentischer Mitarbeiter der AG Reformstudiengang Medizin (Prof. Dr. W. Burger) der Charité, Berlin  |
| 2002    | Mär-Apr   | Famulatur der radiologischen Gemeinschaftspraxis Dr. Wussler, Dr. Bülo, Dr. Eiselt, Dr. Boos in Lörrach   |
|         | Juli-Sept | Famulatur in der Abteilung für Innere Medizin (Prof. Dr. T. Moreira Diop) des Universitätskrankenhauses Le Dantec, Dakar (Sénégal)  |
| 2003-04 |           | Forschungsstipendium der Charité<br><br>Studienfreies Forschungsjahr als Doktorand am Institut für Virologie der Universitätsmedizin Berlin, Charité Mitte, Arbeitsgruppe „Cytomegalieviren“ bei Prof. Dr. S. Prösch. |
| 2004    | Mär-Apr   | Famulatur in der Medizinischen Klinik IV ,Gastroenterologie (Prof. Dr. W. Stremmel) des Universitätsklinikums Heidelberg.   |
|         | Juli-Sept | Famulatur im Emergency Care Center (Prof. Dr. Graham Zinsli) des North Shore Hospital Waitemata, Auckland (Neuseeland).   |
| 2005    | Sept      | 2. Staatsexamen Humanmedizin ( Note:1, 6)   |
| 2005/06 | Okt-Feb   | 1. Tertial des Praktischen Jahres am Institut für Radiologie (Prof. Dr. B. Allgayer)m, Kantonsspital Luzern (Schweiz)   |
|         | ab Feb    | 2. Tertial des Praktischen Jahres an der Klinik für Chirurgie (Prof. Dr. P.M. Schlag), Robert Rössle Klinik, Charité Berlin   |

## Danksagung

Mein Dank gilt dem Direktor des Institutes für Medizinische Virologie der Universitätsmedizin Berlin (Charité), Herrn Prof. Dr. Detlev D. Krüger, für die Möglichkeit, an seinem Institut meine Doktorarbeit anfertigen zu können.

Besonders herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Susanna Prösch, die mich als Leiterin der Arbeitsgruppe „Cytomegalieviren“ im Institut für Virologie bei meiner Arbeit betreute und mir stets mit kompetentem wissenschaftlichem Rat und zeitlichem Einsatz bei der Planung und Durchführung der Experimente zur Seite stand, sowie für die wertvollen Anregungen beim Anfertigen der Dissertation.

Ebenso gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Cytomegalieviren“ für die freundliche Aufnahme im Institut. Hervorheben möchte ich an dieser Stelle Frau Karin Muske, Frau Rita Schilf und Frau Christina Priemer, von denen ich wertvolle praktische Tipps erhielt, und die sich immer Zeit für Hilfestellungen und die Beantwortung von Fragen nahmen.

Bedanken möchte ich mich auch beim Team der Neonatologie Charité Campus Mitte insbesondere ihrem Leiter Prof. Dr. Roland R. Wauer, sowie Frau Dr. Uta Lienicke und Frau Dr. Edda Tschirch für die Betreuung der kleinen Neugeborenen und das gewissenhafte Sammeln der klinischen Proben.

Meiner Familie und meiner Freundin danke ich von ganzem Herzen für die Unterstützung und ihr Verständnis während der nicht einfachen Zeit. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht entstanden.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Johannes Meier geb. 02.03. 1978 in Giessen an Eides statt, dass ich die Dissertation

„Untersuchungen zur Epidemiologie der Mutter-Kind Übertragung des Humanen Cytomegalievirus auf Frühgeborene und zum molekularen Mechanismus der (Re)-aktivierung des Virus während der Laktation“

selbst verfasst habe. Sämtliche benutzten Hilfsmittel und verwendete Literatur habe ich vollständig angegeben.

Die diagnostischen Daten zum ersten Teil der klinischen Studie waren zu Beginn meiner Arbeit bereits vorhanden. Ich habe sie zusammen mit den von mir neu erhobenen Daten des zweiten Studienteils und den experimentellen Daten ausgewertet.

Ich habe oder hatte an keiner anderen Stelle ein Promotionsverfahren beantragt.

Die Arbeit erhält, auch nicht in Teilen, Kopien anderer Arbeiten.

Berlin, August 2004